

**Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Minas Gerais**

Matheus Diniz Pagy

**Organização neural do complexo central no cérebro da
abelha: um estudo comparativo**

Belo Horizonte

Novembro de 2013

Universidade Federal de Minas Geral

Matheus Diniz Pagy

**Organização neural do complexo central no cérebro da
abelha: um estudo comparativo**

Monografia de conclusão do Curso de
Especialização do Programa de Pós
Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador(a): Theo Rolla Paula Mota

Composição da banca:

Prof. Theo Mota (orientador)

Prof. Jérôme Baron (examinador)

Prof. Bruno Rezende (examinador)

Prof. Christopher Kushmerick (suplente)

| | |
|--|----|
| Índice | |
| Agradecimentos | 05 |
| Índice de figuras e tabelas | 06 |
| Lista de abreviações | 08 |
| Resumo | 10 |
| Abstract | 11 |
| 1. Introdução | 12 |
| 1.1. Percepção visual | 12 |
| 1.2. Processamento visual: dos vertebrados aos insetos | 12 |
| 1.3. A abelha doméstica como modelo para estudo da percepção visual | 14 |
| 1.4. Olhos compostos e os fotorreceptores de <i>Apis mellifera</i> | 15 |
| 1.5 Circuitos visuais no cérebro de <i>Apis mellifera</i> | 16 |
| 1.5.1 Lâmina: o início do processamento visual | 17 |
| 1.5.2 Medula, a segunda neurópila visual | 18 |
| 1.5.3 Lóbula, a terceira neurópila visual | 19 |
| 1.5.4 Entrada de informação visual nos corpos pedunculados e comissuras interemisféricas | 19 |
| 1.5.5 O processamento visual em neurópilas centrais | 20 |
| 2. Objetivo geral | 21 |
| 2.1 Objetivos específicos | 21 |
| 3. Metodologia | 22 |
| 3.1. Revisão bibliográfica | 22 |
| 3.2. Preparação neuro-histológica do complexo central de <i>Apis mellifera</i> | 22 |
| 3.3. Marcação específica de populações neuronais | 23 |
| 3.4. Análise da arquitetura neural de <i>Apis mellifera</i> a partir das preparações histológicas | 23 |
| 4. Resultados | 23 |

| | |
|--|----|
| 4.1. O complexo central de insetos: uma revisão | 23 |
| 4.2. Revisão dos complexos centrais | 25 |
| 4.2.1. O complexo central de <i>Drosophila melanogaster</i> | 25 |
| 4.2.2. O complexo central de <i>Schistocerca gregaria</i> | 28 |
| 4.2.3. O complexo central de <i>Apis mellifera</i> | 30 |
| 4.3. Análise das preparações histológicas do cérebro de <i>Apis mellifera</i> em microscopia óptica | 34 |
| 4.3.1. Localização geral do complexo central no protocérebro medial | 34 |
| 4.3.2. A compartimentalização e a sub-compartimentalização do complexo central | 35 |
| 4.3.3. A conectividade no complexo central revelada por marcações neurais globais | 39 |
| 4.3.4. A conectividade no complexo central revelada por marcações neurais específicas | 40 |
| 5. Discussão | 41 |
| 5.1. Semelhanças e diferenças na arquitetura neural do complexo central em <i>Apis mellifera</i> e outros modelos hexápodes | 42 |
| 5.2. Estudo comparativo da conectividade do complexo central de abelhas e outros modelos | 44 |
| 5.3. Possíveis funções do complexo central de abelhas no processamento visual | 45 |
| 6. Referências bibliográficas | 48 |

Agradecimentos

Começo os meus agradecimentos especiais ao meu orientador Prof. Theo Mota pela persistência, paciência e dedicação durante todo este período, sobretudo na reta final, curta e decisiva. Agradeço à banca que se disponibilizou a avaliar o presente trabalho: Prof. Jérôme Baron, Prof. Christopher Kushmerick e Prof. Bruno Rezende. Agradeço novamente o Prof. Jérôme e sua equipe de laboratório, especialmente a Emerenciana (Meré) pela ajuda e apoio. Ao Prof. José Carlos por nos emprestar sua larga habilidade em manejar o micrótomo no preparo das lâminas. A equipe de estagiárias do laboratório dos Prof. Gérman e Cleida, que foram tão prestativas ao ensinar como se monta o material. Aproveito para agradecer o Prof. Remo Russo pela utilização do microscópio usado para tirar as fotografias presentes neste estudo. Agradeço finalmente a minha família, minha noiva Giovana e meus amigos próximos que de alguma forma contribuíram para a consolidação desta etapa.

Os meus profundos e sinceros agradecimentos,

Matheus Diniz Pagy

Índice de figuras e tabelas

- Figura 01- Visão em corte do cérebro da abelha: principais divisões - 13
- Figura 02 – Cérebro da abelha em desenho esquemático, demonstrando o trajeto das principais vias neurais de processamento visual estudadas na abelha - 15
- Figura 03 - Diagrama das diferentes vias visuais (cromática e acromática) do cérebro da abelha, a partir dos fotorreceptores até estruturas centrais - 17
- Figura 04 – Diferentes representações do cérebro de invertebrados, com ênfase nas estruturas do complexo central, vista frontal - 22
- Figura 05 – Estrutura geral do complexo central em *Drosophila melanogaster* - 23
- Figura 06 – Representação da trajetória para linhagens de drosófila - 24
- Figura 07 – Diferentes perspectivas do complexo central em *Schistocerca gregaria* - 26
- Figura 08 - Saída do TOA em direção ao protocérebro medial através do trato do tubérculo óptico acessório - 32
- Tabela 01 – Os tipos de neurônios e os sítios de ramificação dentro e fora do complexo central em *Apis mellifera* - 30
- Figura 09 - Corte transversal do cérebro de abelha doméstica - 33
- Figura 10 – Sequência de cortes de 10µm que indicam o aparecimento do corpo central - 35
- Figura 11 – Sequência de cortes de 10µm mostrando o desaparecimento do corpo central e o surgimento dos nódulos - 36
- Figura 12 – Sequência de cortes de 10µm mostrando a porção posterior do complexo central, a ponte protocerebral - 37
- Figura 13 - Conectividade de neurópilas vizinhas com o complexo central - 39
- Figura 14 – Microinjeções de tetrametilrodamina dextran no CoI e no CoS da abelha revelam conexões intrínsecas e extrínsecas - 40

Figura 15: Marcação da porção pré- e pós-sináptica dos circuitos neurais do CC de *A. mellifera* com anticorpos específicos - 46

Lista das principais abreviaturas

aL – lábio anterior
AOC – comissura óptica anterior
APE – área periesofágial
Ca – cálice do corpo pedunculado
CC – complexo central
CL – corno lateral
CLa – complexo lateral
Co – corpo central
CoI – corpo central inferior
COP – comissura óptica posterior
CoS – corpo central superior
CP – corpo pedunculado
GSO – gânglio subesofágico
ILO – lobo interno da lóbula
LA – lâmina
LAL – lobo acessório lateral
LL – lobo antenal
LP – lobo protocerebral
LM – lobo medial
LMC – células monopolares da lâmina
LO – lóbula
LOs – lobo óptico
LON – nervo óptico lateral
LV – lobo vertical
ME – medula
MON – nervos ópticos medianos
NO – nódulo
NoL – divisão superior do nódulo
NoU – divisão interior do nódulo
NP – neurópila periesofágial
Oc – ocelo
OG – gânglios ocelares

OT – trato óptico

Pe – pedúnculo do corpo pedunculado

POC – comissura óptica posterior

PP – ponte protocerebral

S – soma ou corpo celular

TOA – tubérculo óptico anterior

TTOA – trato do tubérculo óptico anterior

χ_i – quiasma interno

χ_o – quiasma externo

Resumo

O estudo da percepção visual constitui uma das áreas da neurociência que apresentou maior progresso nas últimas décadas, levantando questões intrigantes sobre o processamento visual no cérebro. Na busca por respostas a estas questões, uma abordagem comparativa envolvendo estudos de distintos sistemas visuais pode ser de grande relevância para desvendar similaridades e diferenças na arquitetura neural responsável pelo processamento visual em seus diversos níveis. Neste contexto, modelos animais invertebrados apresentando alta capacidade visual e relativa simplicidade cerebral podem contribuir para desvendar fenômenos de processamento visual dificilmente acessíveis em estudos com modelos vertebrados. A abelha doméstica, *Apis mellifera*, representa hoje um dos principais modelos experimentais para estudos da percepção visual, graças à notável capacidade de processamento visual desempenhada pelo seu pequeno cérebro. Embora inúmeros experimentos comportamentais sobre a percepção visual em abelhas venham sendo desenvolvidos, pouco ainda se sabe sobre as bases neurais do processamento visual neste modelo. Alguns estudos neuroanatômicos e neurofisiológicos descreveram distintas categorias funcionais de neurônios nas diferentes neurópilas periféricas do sistema visual de abelhas, permitindo assim uma certa compreensão sobre os mecanismos neurais primários envolvidos no processamento visual. Apesar disso, os estudos sobre processamento visual de ordem superior no cérebro da abelha são escassos. O presente projeto tem por objetivo estudar a organização e a conectividade neural do complexo central (CC) de abelhas, uma região do protocérebro medial aparentemente envolvida em processos de ordem superior, como a integração, a aprendizagem e a memória visual. Através de distintas preparações neuroanatômicas descrevemos neste estudo alguns aspectos sobre a organização neural do complexo central de abelhas. Em paralelo, uma ampla revisão bibliográfica sobre o complexo central em outros modelos experimentais foi realizada. Pudemos observar uma notável semelhança entre a arquitetura neural observada em abelhas e aquela descrita para outros

insetos como a mosca *Drosophila melanogaster* e o gafanhoto *Schistocerca gregaria*. A partir deste estudo comparativo, discutimos as possíveis funções do complexo central no processamento visual por abelhas.

Abstract

In the past few decades, the study of visual perception has been one of the research fields with utmost progress in neuroscience, which aroused intriguing questions about visual processing in the brain. With the aim of answering to these questions, a comparative approach involving different visual systems can importantly contribute to discover commonalities and differences in the neural architecture underlying visual processing. In this context, invertebrate models with relatively simple brains and great visual capacities can strongly contribute to reveal visual processing phenomena that can hardly be accessed in vertebrate models. The honeybee *Apis mellifera* is considered one of the main animal models for studying visual perception due to the remarkable visual processing capacities displayed by its small brain. Although several behavioral studies have revealed the amazing visual capacities of honeybees at the cognitive level, few studies have been performed to explicitly investigate the neural basis of visual processing. Some neurophysiological and neuroanatomical studies described different functional types of isolate neurons throughout peripheral neuropiles of the honeybee visual system, thus allowing a shallow understanding about the primary mechanisms underlying visual processing. Nevertheless, neurobiological studies on higher order visual processing in the bee brain are scarce. The present work is aimed towards the study of the neural architecture involving the central complex (CC) of the honeybee brain, a protocerebral region that is apparently involved in higher order visual processing, such as visual integration, memory and learning. By using different neuroanatomical techniques, we described some important aspects about the neural organization and the connectivity of the CC in honeybees. In addition, a broad literature review was performed in order to gather information about the neural architecture of the CC in other invertebrate models. We found remarkable similarities between the neural organization of the CC observed in bees and other insect models in neuroscience, such as the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the desert locust *Schistocerca gregaria*. In this comparative study, we discussed the possible functions of the honeybee CC in visual processing.

1. Introdução

1.1. Percepção visual

O mundo que nos rodeia parece ser concreto e imediato, mas nossa forma de enxergá-lo é muitas vezes subestimada. Objetos do mundo apresentam posições, formas e cores que parecem ser percebidas instantaneamente. Podemos movê-los sem o menor esforço aparente. Ainda assim, para que possamos agir e interagir com o mundo que nos circunda, faz-se necessário a ocorrência de uma série de processos visuais complexos que acontecem a todo tempo, e de modo simultâneo, no nosso cérebro (Wade and Swanston, 1991).

Sob o ponto de vista psicofísico, a percepção visual é o processo de aquisição de conhecimento sobre um determinado objeto ou ambiente, a partir da informação extraída luz que o mesmo emite ou reflete (Palmer 1999). Adquirir conhecimento, como ponto principal da percepção visual, faz deste fenômeno uma atividade cognitiva, o que a diferencia fundamentalmente de um mero registro de imagens, como em um processo fotográfico (Palmer 1999). A percepção visual também não pode ser considerada meramente como o conjunto de experiências visuais subjetivas do observador, visto que as ilusões visuais, as alucinações ou os sonhos, embora não sejam elementos reais e externos, são processos oriundos da percepção visual.

Do ponto de vista evolutivo, a percepção visual possui a função de nos permitir interagir com objetos no ambiente que nos cerca (Wade e Swanston, 1991). Objetos desejados, como alimentos, parceiros sexuais e abrigos, são ativamente “procurados” pela nossa visão. Curiosamente, estudos evolutivos atribuem a origem de nossa visão de cores à capacidade de discernirmos os frutos maduros em contraste à folhagem verde (Mollon1989, Bowmaker 1991). A capacidade de perceber perigos à nossa volta, como predadores ou desastres ambientais, também parece ter moldado a percepção humana, a fim de obter maior sucesso evolutivo perante estes fatores (Wade e Swanston, 1991).

1.2. Processamento visual: dos vertebrados aos insetos

Processar uma cena envolve uma série de complexas transformações fisiológicas que ocorrem através de estágios sucessivos, a partir da retina, até alcançar o cérebro. No sistema visual dos vertebrados, a informação é inicialmente processada pela rede retinal. Sequencialmente feixes paralelos de informação suprem centros superiores de processamento, como o córtex visual, onde diferentes atributos do estímulo visual são extraídos por circuitos neuronais específicos (Hubel e Livingstone 1987; Callaway 2005). Insetos possuem uma conformação de processamento visual bastante similar àquela observada em vertebrados, sendo a informação visual originada nos fotorreceptores transformada e segregada em vários estágios de processamento até que seja integrada em áreas superiores do cérebro (Strausfeld, 1989; Strausfeld e Lee, 1991; Douglass e Strausfeld 1998, Pfeiffer et al.. 2005; Yamaguchi et al.. 2008, Paulk et al.. 2008, Mota et al. 2011).

Embora uma vasta literatura em neurofisiologia demonstre que atributos visuais como posição, orientação, cor e movimento são processados em paralelo no cérebro, a percepção visual ocorre geralmente de forma coerente e unificada. Diante destas observações, questionamentos acerca da integração de tais sistemas ainda permanecem sem respostas (Wade e Swanston 1991, Callaway 2005). No intuito de responder a estas perguntas, o estabelecimento de uma abordagem comparativa envolvendo estudos de distintos sistemas visuais tem sido de grande relevância para desvendar similaridades e diferenças na arquitetura neural e nos processos cognitivos responsáveis pelo processamento visual em seus diversos níveis (Giurfa 2007, Srinivasan 2012).

Dentro desta perspectiva, modelos animais invertebrados apresentando alta capacidade visual e relativa simplicidade cerebral podem contribuir para desvendar fenômenos de processamento visual dificilmente acessíveis em estudos com modelos vertebrados (Giurfa 2003, Giurfa 2007). Assim, insetos como a mosca *Drosophila melanogaster*, o gafanhoto *Schistocerca gregaria* e a abelha *Apis mellifera* vem sendo utilizados como modelos altamente vantajosos para estudos da percepção visual, tendo sido responsáveis por varias das descobertas de maior impacto nesta área (Giurfa 2007, Mota 2011, Srinivasan 2012). No presente estudo, buscamos ampliar nossos conhecimentos sobre o processamento visual de ordem superior, investigando a organização e a conectividade em áreas integrativas centrais do sistema visual no cérebro da abelha doméstica, *Apis mellifera*.

1.3. A abelha doméstica como modelo para estudos da percepção visual

Ao longo de várias décadas, a abelha tem sido usada como organismo modelo em diferentes campos da neurociência (Giurfa 2003, 2007). O cérebro da abelha é mais simples que o de vertebrados, porém, funcionalmente, seu sistema visual é extremamente rico e em vários aspectos similar ao dos primatas. Estudos pioneiros já demonstravam as incríveis capacidades visuais deste inseto e as notáveis similaridades, em termos psicofísicos, aos processos cognitivos de percepção visual em outros modelos vertebrados, incluindo o homem (Menzel and Blakers 1976, Backhaus et al. 1987, Backhaus 1992, Vorobyev et al. 2001, Avarguès-Weber et al. 2011; Dyer et al. 2011). Em 1914, Karl von Frisch demonstrou que as abelhas possuem visão de cores. Posteriormente, Daumer (1956) mostrou que a visão de cores em abelhas domésticas é tricromática, seguindo um princípio de organização similar ao dos seres humanos (Menzel e Backhaus 1991). Desde então, muitos estudos comportamentais foram desenvolvidos para descrever a discriminação e a aprendizagem de cores nas abelhas. A maioria destes estudos revelou similaridades impressionantes entre abelhas e seres humanos no nível perceptual (Neumeyer 1981, Werner et al. 1988, Backhaus 1991, Benard and Giurfa 2008).

Abelhas também aprendem e memorizam outros atributos visuais como formas, padrões, orientação, direção, contraste, intensidade luminosa, profundidade e movimento, importantes no processamento de cenas visuais complexas, no controle do voo e utilização de coordenadas visuais para a exploração dos locais de interesse, entre os quais se destacam as flores e a colmeia (Srinivasan 1994; Giurfa e Lehrer 2001). Neste rico cenário visual, as abelhas são capazes de criar categorias visuais complexas, estabelecer relações espaciais entre diferentes objetos, e assim extrair conceitos visuais de alto nível (Menzel 1985, Menzel et al. 1993, Menzel 1999). Essas incríveis capacidades visuais, adicionalmente associadas a um vasto processamento de estímulos visuais celestes, como a posição do sol e o padrão de luz polarizada no céu, proporcionam à abelha uma elaborada e muito eficiente estratégia de navegação (Wehner and Rossel 1985, Rossel and Wehner 1986; Menzel and Giurfa 1997; Collett and Collett 2002; Collett et al. 2003).

1.4. Os olhos compostos e os fotorreceptores de *Apis mellifera*

As abelhas operárias detectam objetos através dos seus olhos compostos constituídos de aproximadamente 5.500 omatídeos. Cada um destes omatídeos acolhe nove células fotorreceptoras (R1-9, Gribakin 1975). Os pigmentos visuais dos fotorreceptores estão localizados nas microvilosidades que formam um rabdômero fotorreceptor. Os principais fotorreceptores R1-8 distribuem-se pelas microvilosidades de todo o comprimento do rabdoma, enquanto as R9 distribuem-se apenas nas microvilosidades da base da omatídeo (Gribakin, 1975). Três tipos de fotorreceptores, S, M e L (para comprimentos de onda curto, médio e longo, respectivamente), cujos pico de absorção incidem nas regiões ultravioleta, azul e verde do espectro, respectivamente, foram identificados na retina de abelhas (Peitsch et al. 1992). Experimentos comportamentais e psicofísicos revelaram que a informação acromática é processada pelo receptor de canal L, enquanto a visão cromática utiliza os três canais dos receptores (Menzel e Backhaus 1991). Os omatídeos do olho da abelha podem ser divididos em três tipos diferentes (Wakakuwa 2005). Embora todos os três tipos de omatídeos contenham seis receptores L, omatídeos do tipo I (44% do total) contêm um receptor S e um M, omatídeos do tipo II (46% do total) contêm dois receptores S, e os omatídeos do tipo III (10% do total) têm dois receptores M. Cada omatídeo também apresenta um nono receptor basal, cuja função exata ainda não está elucidada (Wakakuwa 2005).

A abelha possui três ocelos localizados na face dorsal da cabeça, localizados entre seus olhos compostos. Cada ocelo apresenta cerca de 800 células fotorreceptoras (Toh e Kuwabara 1974). As lentes dos ocelos são divididas em partes dorsais e ventrais. A retina dos ocelos também é dividida em: uma porção ventral, orientada para o céu e uma porção dorsal, orientada para o horizonte. O plano focal das lentes localiza-se atrás da retina nos ocelos laterais, diferentemente do ocelo central, cujo plano focal estabelece-se sobre a retina dorsal. As células fotorreceptoras da porção ventral da retina tem o tamanho médio de 25µm, com pigmentação densa. Já as células da porção dorsal da retina dos ocelos apresentam tamanho médio de 60µm, com pigmentação esparsa. Os pares de células da retina dos ocelos formam folhetos de rabdômeros planos e não-retorcidos, resultando em conformações cruzadas, de aproximadamente 8µm x 1µm cada eixo. Ao longo da retina, a distribuição cruzada destas células assume uma geometria cuja orientação assemelha-

se a um leque. Em cada ocelo, as células da retina (ventral e dorsal) projetam seus axônios para duas neurópilas distintas, convergindo em alguns neurônios gigantes na porção dorsal e em alguns neurônios menores na neurópila ventral. Esta natureza segregada dos ocelos, assim como o arranjo espacial dos rabdômeros característico, sugere que os ocelos forneçam também informação sobre a luz polarizada do céu (Ribi et al. 2011)

1.5. Circuitos visuais no cérebro de *Apis mellifera*

Fotorreceptores são apenas os componentes periféricos do processamento visual, que transmitem a informação visual para o cérebro da abelha. A percepção visual é criada, de fato, pelo processamento neuronal que ocorre no cérebro. A questão fundamental é, por conseguinte, como os circuitos neuronais visuais são organizados em etapas sucessivas dentro do cérebro de abelha para gerar tal percepção (Mota et al. 2011).

O cérebro de uma abelha contém cerca de 960.000 neurônios e tem um volume de aproximadamente 1,0 mm³ (Giurfa 2003). Este pequeno cérebro bissimétrico inclui as seguintes regiões principais (Figura 1, Brandt 2005): lobos antenais (LL), corno lateral (CL); lobos ópticos (LOs); corpos pedunculados (CPs); lobos protocerebrais (LPs); complexo central (CC); complexo lateral (CLa); neurópilas periesofageais (NPs); gânglio subesofágico (GSO). Dentre as regiões supracitadas, participam do processamento visual as neurópilas componentes dos LOs, CPs, LPs, CC e CLa (Figura 1).

O lobos ópticos (LOs), principais estruturas estudadas até o momento no sistema visual de insetos, são formados por três neurópilas sucessivas: a lâmina (LA), a medula (ME) e a lóbula (LO) (Srinivasan 2012). Estes são os principais centros periféricos de processamento visual no cérebro de abelhas, que recebem e processam informações dos fotorreceptores presentes na retina. A partir destas neurópilas, a informação visual parte para centros superiores de processamento, como os CPs, os LPs, o CC e o CLa. Pouco se sabe sobre a organização e o funcionamento destes centros superiores de processamento visual em abelhas, especialmente aqueles localizados na porção centro-medial do cérebro. No presente estudo, procuramos aumentar nosso conhecimento sobre as neurópilas centro-mediais envolvidas no processamento visual no cérebro de abelhas.

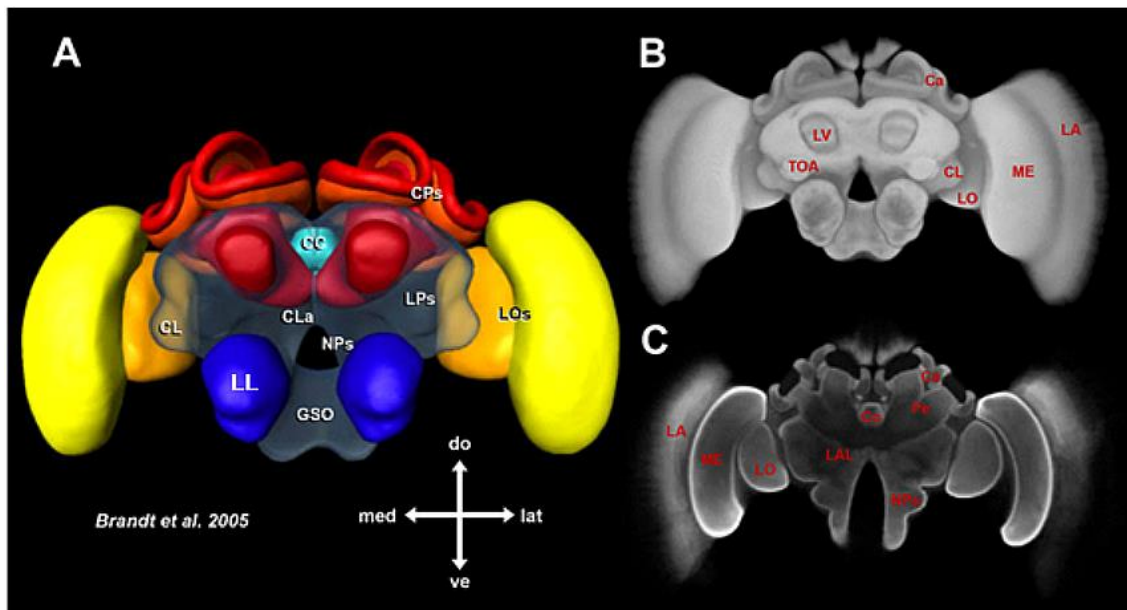


Figura 01 – **A:** visão frontal tridimensional do cérebro da abelha, com destaque a algumas neurópilas. **B:** visão frontal da porção anterior. **C:** visão frontal posterior. Abreviaturas: CL: corno lateral; CP: corpo pedunculado; ME: medula; LO: lóbula; LL: lobo antenal; LOs: lobos ópticos; GSO: gânglio subesofágico; Co: corpo central; Pe: pedúnculo; Ca: cálice CC: complexo central; CLa: cálice lateral; LPs: lobo protocerebral. NP: neurópila periesofágica; TOA: tubérculo óptico anterior; LV: lobo vertical; LA: lâmina; LAL: lobo acessório lateral. Retirado de Brandt 2005.

1.5.1. Lâmina: o início do processamento visual

A primeira neurópila visual dos lobos ópticos (LOs) da abelha, a lâmina (LA), recebe entrada essencialmente dos axônios provenientes dos fotorreceptores-L, que fornecem informações para as vias de processamento acromático (Figura 2) (Menzel 1974; Ribi 1975a,b). Em abelhas, a LA contém uma maioria de neurônios que apresenta pouca variação de resposta para diferentes comprimentos de onda (Menzel 1974, Ribi 1975a,b). Os axônios dos fotorreceptores L na lâmina conectam-se a interneurônios de primeira ordem, as células monopolares da lâmina (LMC) (Menzel 1974). A lâmina é composta por milhares de colunas ópticas, cada uma delas recebendo um agrupamento de axônios dos omatídeos adjacentes, assim como os axônios de quatro tipos diferentes de células monopolares (Figura 2). Além disso, algumas fibras tangenciais, centrífugas e horizontais podem ser encontradas dentro de cada agrupamento. O arranjo espacial dos axônios fotorreceptores e das LMC dentro de um agrupamento permanece constante ao longo da lâmina, retendo assim a organização retinotópica.

1.5.2. Medula: a segunda neurópila visual

Axônios das células monopolares da lâmina e dos receptores S e M prosseguem para a segunda neurópila visual, a medula (ME; Figura 2). A medula é a estrutura que contém a maior porção de neurônios dentro do sistema visual da abelha (Ribi e Scheel 1981). O quiasma exterior (χ_o) estabelece a ligação entre a LA e a ME. As fibras das LMC provenientes da parte anterior da lâmina projetam-se em direção à medula posterior, enquanto as fibras posteriores da lâmina projetam-se para a porção anterior da medula (Figura 2). Assim, a organização retinotópica é mantida, mas invertida a partir da LA para a ME, a qual também se organiza em um padrão colunar. As colunas medulares são altamente conectadas por fibras horizontais (neurotransmissão serotoninérgica ou GABAérgica;), em contraste com as colunas da lâmina, que possuem poucas conexões horizontais (neurotransmissão principalmente serotoninérgica) (Ribi 1975a,b; Bicker et al. 1987; Ehmer e Gronenberg 2002).

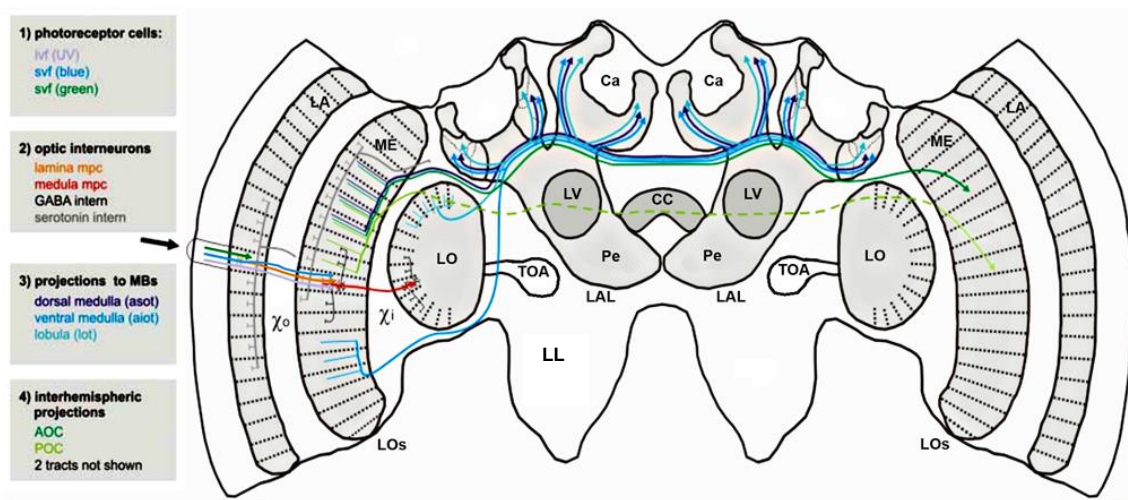


Figura 02 – Cérebro da abelha em desenho esquemático, demonstrando o trajeto das principais vias neurais de processamento visual estudadas na abelha. A seta preta indica um estímulo visual. Abreviaturas: χ_o : quiasma externo, χ_i : quiasma interno; LOs: lobo óptico; CC: complexo central; CP: corpo pedunculado; ME: medula; LO: lóbula; LL: lobo antenal; GSO: gânglio subesofágico; Co: corpo central; Pe: pedúnculo; Ca: cálice; TOA: tubérculo óptico anterior; LV: lobo vertical; LA: lâmina; LAL: lobo acessório lateral. LL: lobo antenal Adaptado de Mota 2011.

Neurônios da ME são os primeiros do sistema visual a apresentar respostas com oposição espectral, ou seja, com atividade excitatória para um comprimento de onda (λ) e inibitória para outro λ oposto (Kien e Menzel, 1977; Hertel et al., 1978; Paulk et al., 2009a), propriedade característica da visão de cores em primata. Pelo menos 10 tipos de neurônios com oposição de cores foram descritos em abelhas, com base nas interações entre as vias fotorreceptoras S, M e L (Kien e Menzel 1977; Hertel et al. 1978; Yang et al., 2004). Registros intracelulares de neurônios medulares de abelhas demonstraram que as respostas neuronais de oposição cromática são observadas com mais frequência nas

camadas internas da medula, enquanto as camadas externas da medula são em grande parte acromáticas e mais sensíveis ao movimento (Paulk ET, AL. 2009a,b).

1.5.3. Lóbula: a terceira neurópila visual

A terceira neurópila visual é a lóbula (LO), onde a organização colunar e a estratificação retinotópica são preservadas apenas na parte exterior (Hertel et al.. 1987). O quiasma interior (χ_i) estabelece a ligação entre a ME e a LO, onde a organização retinotópica é novamente invertida no eixo ântero-posterior (Figura 2). As propriedades cromáticas dos neurônios na medula são preservadas e ampliadas na LO, que também contém muitos neurônios com oposição cromática (Hertel 1980, Paulk et al.. 2008, Yang et al. 2004). Numerosos neurônios com respostas de oposição espacial estão presentes na LO (Hertel et al. 1987, Yang et al. 2004). Estes neurônios exibem respostas excitatórias para uma orientação espacial específica e inibitórias para outra orientação espacial oposta (p. ex. excitação para 45° e inibição para 135°). Assim como a ME, a LO é uma estrutura em camadas com uma sensibilidade de cor mais pronunciada nas camadas internas, enquanto que as camadas externas são principalmente acromáticas e sensíveis ao movimento (Ribi e Scheel 1981; Paulk et al. 2008). Estes dados sugerem que as vias acromáticas e cromáticas são segregadas em diferentes etapas do processamento visual no cérebro da abelha.

1.5.4. Entrada de informações visuais nos corpos pedunculados e comissuras inter-hemisféricas

Tratos diferentes conectam os lobos ópticos aos corpos pedunculados (CP; Figura 2), estruturas cerebrais de ordem superior associadas à integração sensorial multimodal e a fenômenos cognitivos (Mobbs 1984; Ehmer e Gronenberg 2002; Paulk e Gronenberg 2008; Menzel 1999; Giurfa 2007). Em abelhas, alguns dos principais estímulos aferentes visuais recebidos pelos CPs são cromáticos (Gronenberg 1986; Ehmer e Gronenberg 2002; Mauelshagen 1993; Menzel e Manz 2005; Paulk e Gronenberg 2008). A ME projeta neurônios em diferentes tratos que a conectam aos CPs de ambos os hemisférios cerebrais (Mobbs 1984). A LO também projeta neurônios em pelo menos dois tratos que a conectam aos CPs de ambos os hemisférios cerebrais (Mobs 1984). Além disso, diversas comissuras inter-hemisféricas conectam os lobos ópticos de ambos os hemisférios cerebrais (Figura 2: comissura óptica anterior, AOC e comissura óptica posterior, POC) (Mobbs 1984, Ehmer e Gronenberg 2002).

1.5.5. O processamento visual em neurópilas centrais

Trabalhos recentes utilizando registros intracelulares de neurônios visuais em abelhas sugerem que as vias cromática e acromática no sistema visual central da abelha são segregadas no protocérebro anterior e posterior, respectivamente (Figura 3) (Paulk et al.. 2009b; Dyer et al. 2010). As camadas mais internas da LO e da ME, mais propensas a apresentar respostas de sensibilidade cromática, enviam projeções para áreas cerebrais anteriores, particularmente para o CP e o protocérebro lateral anterior (Gronenberg 1986; Paulk e Gronenberg 2008; Paulk et al.. 2008; 2009ab). Por outro lado, as camadas mais externas da LO e ambas as camadas internas e externas da ME, projetam neurônios tanto para o protocérebro lateral anterior, quanto o protocérebro lateral posterior (Paulk et al.. 2008; 2009a,b; Dyer, 2010).

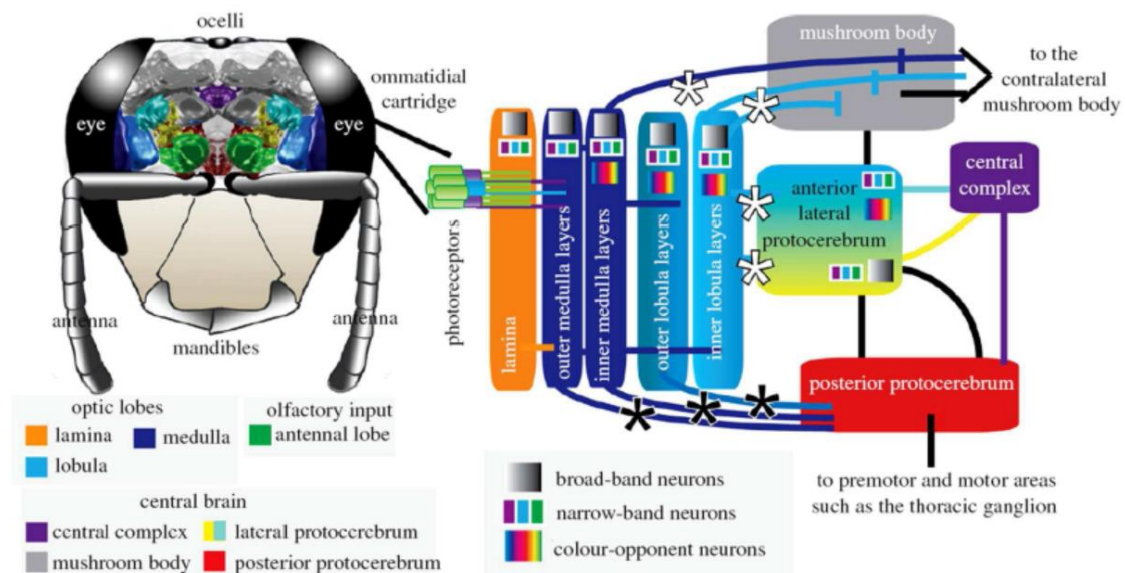


Figura 03 - Diagrama das diferentes vias visuais (cromática e acromática) do cérebro da abelha, a partir dos fotorreceptores até estruturas centrais. Duas grandes vias visuais podem ser delineadas: 1 – predominantemente acromática: neurônios das camadas externas da medula e da lóbula em direção ao protocérebro posterior: apresentam menor adaptação e menor precisão do tempo de ativação(asteriscos pretos), 2- predominantemente cromática: neurônios das camadas internas da medula e da lóbula em direção ao protocérebro lateral e corpos pedunculados: exibem adaptação a estímulos e aumento da precisão do tempo de ativação(asteriscos brancos). Figura extraída de Dyer et al. 2010.

Alguns neurônios registrados no protocérebro lateral anterior de abelhas, especialmente aqueles conectados ao tubérculo óptico anterior (TOA, figura 02), apresentam propriedades de resposta com sensibilidade cromática (Paulk et al.. 2008, 2009b; Mota et al. 2011). Além disso, demonstrou-se recentemente que os circuitos neuronais do TOA

contribuem para a visão espacial através de uma segregação do processamento da informação visual proveniente das partes dorsal e ventral do olho (Mota et al. 2011, 2013).

Aparentemente, parte da informação processada no protocérebro lateral é enviada ao protocérebro lateral posterior e às neurópilas centro-mediais do cérebro, especialmente para uma região conhecida como complexo central (CC). Até o momento, apenas alguns neurônios isolados foram registrados no CC de abelhas (Homborg 1985, Milde 1988), mas a arquitetura e a conectividade neural desta região cerebral foram pouco estudadas (Mota et al. 2011). Devido à sua posição superior em relação às demais neurópilas visuais, assim como o grande volume de neurônios aparente em sua estrutura, acredita-se que o CC esteja envolvidos nas etapas finais de integração visual e visuo-motora. Apesar disso, a pequena quantidade de neurônios registrados nesta região não permite ainda obter-se uma compreensão sobre a função desta neurópila no processamento visual. Neste estudo, procuramos aumentar nossa compreensão sobre a organização funcional do CC de *Apis mellifera* através de um estudo neuroanatômico, combinado a análises comparativas. Comparando nossos dados anatômicos a uma ampla revisão bibliográfica sobre a arquitetura neural do complexo central em outros insetos, buscamos avançar nosso conhecimento sobre as bases neurais do processamento visual de ordem superior.

2. Objetivo geral

Estudar a arquitetura neural e inferir as possíveis funções do complexo central no processamento visual em *Apis mellifera*.

2.1 Objetivos específicos:

- i) Realizar uma revisão bibliográfica sobre a estrutura neural e as funções do complexo central em insetos;
- ii) Estudar a organização neural e a conectividade do complexo central em abelhas através de técnicas de neuroanatomia funcional;
- iii) Estabelecer um estudo comparativo entre os modelos animais estudados, analisando similaridades e diferenças neuroanatômicas que permitam inferir as possíveis funções do complexo central no processamento visual de ordem superior.

3. Metodologia

3.1. Revisão bibliográfica

Uma ampla revisão bibliográfica foi realizada com o objetivo de levantar artigos publicados na área de neurociência comparada que abordassem aspectos neuroanatômicos e/ou neurofisiológicos envolvendo o complexo central. Durante a busca, foram utilizadas, principalmente, as seguintes palavras chave: *insect*, *brain*, *neurons*, *central complex*, *medial protocerebrum*, *visual processing*, *Apis mellifera*, *Schistocerca gregaria*, *Drosophila melanogaster*. Por fim, 24 artigos foram selecionados e serviram como base de estudos para o presente trabalho. As referências bibliográficas citam, além dos artigos selecionados, outros artigos que se relacionam com o assunto.

3.2. Preparação neuro-histológica do complexo central de *A. mellifera*

Abelhas operárias da espécie *Apis mellifera* foram capturadas na área do campus da UFMG. As abelhas foram anestesiadas a frio, sendo decapitadas logo em seguida. A cabeça foi fixada em um recipiente coberto de cera de abelha e posicionada sob um estereomicroscópio para a retirada do cérebro. O cérebro foi retirado com a cabeça imersa em PBS, 0,1M para evitar a ressecamento do mesmo. Os cérebros retirados foram fixados em paraformaldeído 4,0%. Para a montagem das lâminas, os cérebros foram lavados em PBS e corados em solução aquosa de tetróxido de ósmio (1%) por 2h à temperatura de 4° C e mais 1h à temperatura ambiente. Os cérebros foram lavados em PBS e posteriormente passaram por uma série crescente de desidratação em álcool. Os cérebros foram então tratados para inclusão em resina de metacrilato e depois incluídos para o corte. Os cérebros foram cortados em um micrótomo com lâmina de vidro em cortes de 10µm de espessura. Em algumas preparações os cortes corados por ósmio foram posteriormente imersos em banho de azul de toluidina (0,2%) por 2 minutos, para aumentar o contraste dos elementos axoplasmáticos. Após a ação da Toluidina, as lâminas foram lavadas em PBS. Todas as lâminas foram seladas com Entellan (Merck, Brasil) e cobertas por lamínula.

3.3. Marcação específica de populações neuronais

Para analisar populações específicas de neurônios com conexões no CC, abelhas foram fixadas individualmente em um suporte plástico. Para estabilizar a preparação, a cabeça,

as antenas, o tórax, as patas e as asas foram imobilizadas usando-se cera de baixo ponto de fusão. Uma pequena janela foi aberta na região fronto-dorsal da cabeça com o uso de um micro-bisturi. Glândulas salivares e uma pequena parte da membrana traqueal foram removidas para expor a superfície cerebral. Eletrodos finos de borossilicato cobertos na ponta com cristais de tetrametilrodamina-dextran (10,000 kDa, Invitrogen) foram inseridos na região do CC, usando-se coordenadas neuroanatômicas definidas para o cérebro da abelha (Mota et al. 2011). A pequena janela na cabeça da abelha foi posteriormente selada com o pedaço original de cutícula usando-se cera. Para permitir a migração retrógrada e anterógrada do corante dextran dentro das vias neuronais injetadas, a abelha foi mantida viva por pelo menos 12 horas. Após esse período os cérebros foram removidos, fixados, desidratados, seccionados e montados em lâminas como descrito na seção anterior (3.2).

3.4. Análise da arquitetura neural de *A. mellifera* a partir das preparações histológicas

As lâminas histológicas preparadas conforme a seção 3.2 foram analisadas em um microscópio óptico MOTIC BA310 e fotografadas com uma câmera digital MOTIC BA310, resolução 3.0MP. As lâminas preparadas conforme a seção 5.3 foram analisadas em um microscópio de fluorescência ZEISS M210 e fotografadas com uma câmera digital SPOT 2, resolução 5.0MP.

Fotografias seriadas de diferentes profundidades do cérebro foram adquiridas para análises qualitativas e quantitativas da compartimentalização e arquitetura neural do Complexo Central (CC). Buscou-se analisar nas lâminas obtidas, padrões morfológicos similares aos descritos em outras espécies (*Schistocerca gregaria* e *Drosophila melanogaster*), assim como particularidades do CC de abelhas. A partir desta análise, estabeleceu-se um estudo comparativo.

4. Resultados

4.1. O complexo central de insetos: uma revisão

O complexo central (CC) é uma estrutura identificada tradicionalmente no cérebro dos insetos hexápodes. A posição centro-medial desta estrutura, localizada ventralmente em relação aos cálices (Ca) dos CPs e dorsalmente em relação aos pedúnculos (Pe) dos CPs no protocérebro posterior, aplica-se para todos os insetos hexápodes estudados até o momento (Loesel 2002, Boyan 2011). Nestes insetos, o complexo central divide-se em 3

compartimentos principais: o corpo central (Co), estrutura em forma de leque; a ponte protocerebral (PP), estrutura alongada dorso-lateralmente; e um par de nódulos (NO), estruturas esféricas dispostas ventro-posteriormente em relação ao Co. O Co é constituído por duas subdivisões bem definidas: a divisão superior (CoS) e a divisão inferior (CoI). As neurópilas do CC são separadas das neurópilas ao redor por um folheto glial e apresentam uma arquitetura notoriamente modular e bem definida, caracterizada pela presença de estratificação colunar (Homberg 2008).

A presença do CC já foi também investigada em alguns grupos de invertebrados externos aos insetos hexápodes, a fim de se estabelecer uma análise comparativa, sob a perspectiva evolutiva. Em *Onicophora*, a única estrutura identificada fora o corpo arqueado, homólogo ao corpo central (Loesel et al. 2002, Figura 04a). Além disso, no grupo dos *Chelicerata*, foi identificado também o corpo arqueado (Strausfeld 1998, Figura 04b). Finalmente, observou-se a presença do Co no cérebro de *Miriapoda* (quilópodes e diplópodes, Holmgren, 1916; Joly and Descamps, 1987; Loesel et al., 2002) e também de alguns subgrupos da superclasse *Crustacea*, que além do Co possuem também a PP na estrutura do CC (Sandeman et al. 1990, Figura 04c). Os grupos e sua história evolutiva foram reunidos em um extenso estudo de revisão bibliográfica sobre o assunto, realizado por Homberg (2008).

Nos poucos insetos hexápodes em que a conectividade do CC já fora estudada (principalmente *Drosophila melanogaster* e *Schistocerca gregaria*), esta estrutura está ventro-lateralmente conectada ao lobo acessório lateral (LAL) do protocérebro medial (Homberg 2008). Nestes insetos, a função do CC tem sido relacionada com: i) coordenação do comportamento motor (Homberg 1985, Strauss 2002, Bender 2010); ii) processamento de informações multimodais (Homberg 1985, Milde 1988); iii) aprendizagem e memória visual (Sitnik et al. 2001, Liu et al. 2006); iv) processamento de luz polarizada (Homberg 2008, 2009). A seguir, apresentaremos uma revisão sobre o CC dos dois modelos principais nos quais a organização neural e a função desta estrutura vêm sendo estudadas: o gafanhoto-do-deserto (*Schistocerca gregária*) e a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*).

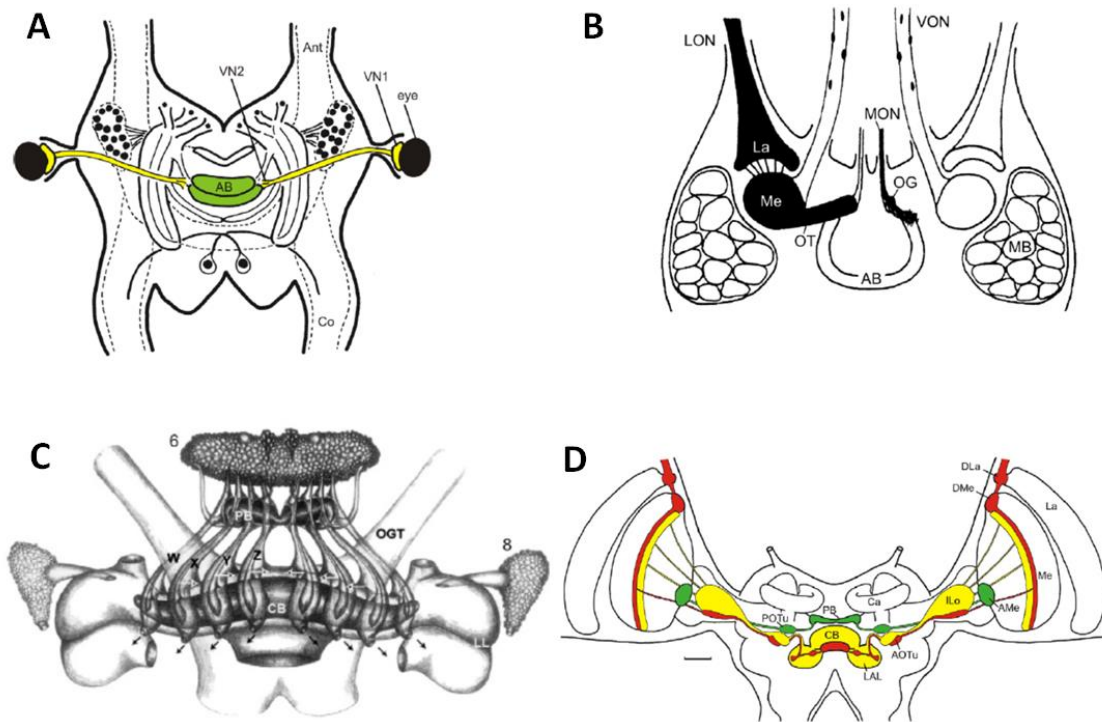


Figura 04 – Desenhos esquemáticos do cérebro de invertebrados, com ênfase nas estruturas do complexo central, visão frontal. **A:** O corpo arqueado no cérebro de um Onicóforo, *Peripatoides leuckarti*, visão dorsal. AB – corpo arqueado, VN1 e VN2 - Neurópilas visuais; Ant – nervo antenal; Co – comissura para o cordão nervoso ventral. **B:** corpo arqueados em um Quelicerado, *Limulus polyphemus*, AB – corpo arqueado; LON – nervo óptico lateral; La – lâmina; Me – medula; OT – trato óptico; MON – nervos ópticos medianos; OG – gânglios oclares; MB (CP) – corpos pedunculados; VON – nervo óptico ventral. **C:** reconstrução tridimensional do complexo central de um crustáceo, *Cherax destructor*, visão ventral. W,X,Y,Z - fibras nervosas; CB – corpo central; PB – ponte protocerebral; OGT – trato globular olfatório. LL – lobo lateral. **D:** visão geral do cérebro de um hexápode, *Schistocerca gregaria*. AMe – medula acessória; ILo – lobo interno da lóbula; AOTu (TOA)– tubérculo óptico anterior; Ca – cálices do corpo pedunculado; Povo – Tubérculo óptico posterior. Adaptado de Homberg, 2008.

4.2. Revisão dos complexos centrais

4.2.1. O complexo central da *Drosophila melanogaster*

Na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, as neurópilas (Figura05) que compõem o CC apresentam outra nomenclatura: o *ellipsoid body* (corpo elipsoide) corresponde ao corpo inferior (CoI); o *fan shaped body* (corpo arqueado) corresponde corpo superior (CoS). As demais neurópilas possuem a mesma nomenclatura das estruturas encontradas nos outros insetos. Para efeitos comparativos, o presente estudo irá considerar a nomenclatura padrão: CoS, CoI, PP e NO. Em *D. melanogaster*, todas estas neurópilas são interconectadas por conjuntos de interneurônios que formam padrões regulares de projeções neuronais (Hanesch et al. 1989). O CC recebe entrada de muitas partes do cérebro, porém tratos originados de áreas motoras e sensoriais não são percebidos de tal maneira que possa se concluir sua função (Strauss 2002).

Na *Drosophila*, traços de memória para parâmetros de objetos visualizados como orientação das bordas, são atribuídos a tipos de neurônios específicos com ramificações

que alcançam a CoS, sugerindo que o CC desempenhe um papel no reconhecimento de objetos ou detecção de características (Liu et al. 2006). Experimentos comportamentais apontaram a participação da CoI na memória de trabalho espacial durante a locomoção (Liu et al 2006).

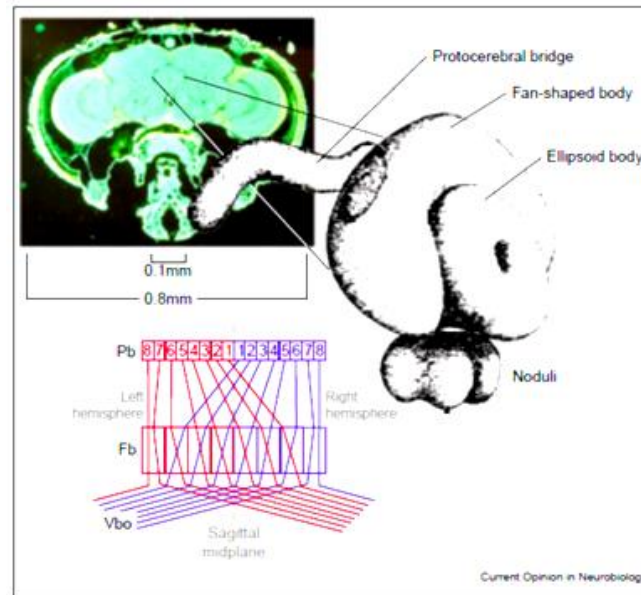


Figura05 - Secções frontais da mosca *Drosophila*. A fluorescência destaca de verde as neurópilas e os somas em amarelo. O complexo central (CC) localiza-se no meio, entre os hemisférios cerebrais do protocérebro, compreendendo quatro regiões interligadas: O CoS, o CoI, a ponte protocerebral e os nódulo emparelhados. Neurônios colunares no CC formam muitos sistemas de projeção ordenados que pareçam mais adequados para a sobreposição, comparação e equilíbrio da informação neuronal de ambos os lados do cérebro. O diagrama de linha mostra uma representação do sistema das fibras horizontais, que ligam os dois hemisférios a partir de oito glomérulos da ponte protocerebral (PP), com os oito neurônios do CoS, saindo do CC em direção às área acessórias emparelhadas, denominadas lobos acessórios laterais LAL. Adaptado de Strauss 2002.

Os estudos comportamentais com a mosca da fruta foram conduzidos em animais mutantes, nos quais a formação de áreas específicas do CC fora comprometida (Strauss 2002). As mutações que afetam o complexo central foram associadas a defeitos na marcha das moscas. Animais de linhagens mutantes com a estrutura do complexo central alterada, movem-se, de maneira geral, mais vagarosamente que moscas selvagens (Strauss 2002). Além disso, as moscas mutantes para o CC reagem mais lentamente a mudanças de estímulos durante o voo e apresentam alteração do controle de orientação perante marcos visuais (Strauss 2002).

Linhagens de moscas que apresentam mutações que influenciam na arquitetura do CoI e do CoS, apresentam marcha menos pronunciada, com cerca de metade da taxa de deslocamento em comparação a moscas de linhagens selvagens. Além disso, certas

linhagens foram incapazes de caminhar em linha reta, o que se observa no padrão de marcha observado na figura 06a (Strauss 2002). Este último dado sugere que o complexo central também participe da orientação espacial e motora. Linhagens mutantes que apresentavam defeitos na PP e no CoS, apresentaram velocidade de marcha reduzida a um quarto da velocidade normal, queda na atividade motora e padrão de movimentação circular (Strauss 2002).

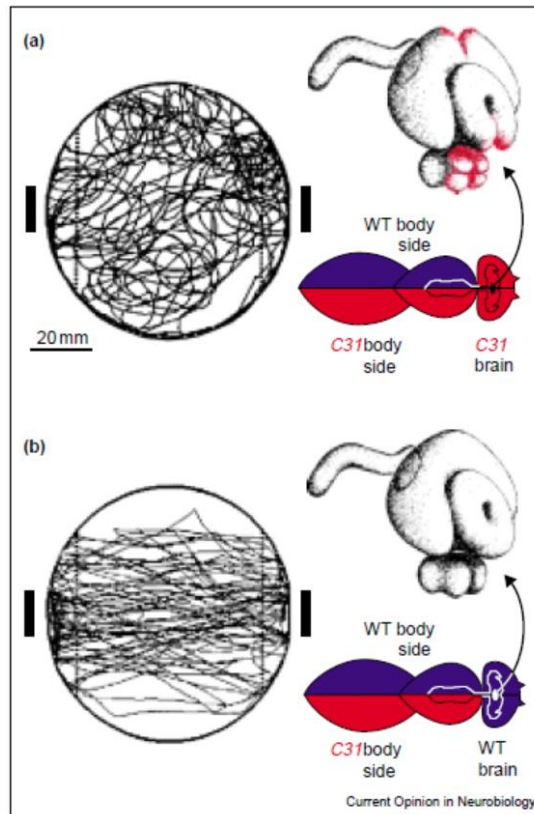


Figura 06 – Representação da trajetória para linhagens de drosófila: (a) *C31_{brain}*, cujas estruturas do complexo central apresentam secções (áreas destacadas em vermelho): trajetória circular para o lado mutante; (b) *C31_{body}*, com as estruturas cerebrais intactas: trajetória retilínea, movimentação lenta. Adaptado de Strauss 2002.

Mutantes que apresentaram a ponte protocerebral lesada medialmente não conseguem alcançar objetos atraentes em linha reta. Sua trajetória é irregular e errante, em comparação às moscas do tipo selvagem. Além disso, mutantes cuja PP estava lesionada, apresentaram também um aumento anormal do tamanho do passo, o que afeta diretamente a marcha de tais animais, ou a sua taxa de deslocamento (Strauss 2022).

Concluindo, a integridade do complexo central é indispensável para a normalidade da marcha da *Drosophila*: a CoI controla a temporização do padrão do impulso de marcha, enquanto a PP e a CoS são fundamentais para dar ritmo à marcha. Interferências

genéticas, produzindo algumas linhagens de mutantes, identificaram o complexo central como o principal centro de controle motor, em conjunto com os corpos pedunculados, além da lateralização da locomoção (Strauss 2002).

Estudos atribuíram também ao complexo central como componente ativo no processamento de memória de trabalho visual para o reconhecimento de padrões. Mutantes portadores de anormalidades estruturais no CC não conseguiam reconhecer e aprender padrões. Os animais foram incapazes de recordar os padrões previamente apresentados. Enquanto a memória olfativa está relacionada aos corpos pedunculados da *Drosophila*, a memória visual está associada ao CoS do complexo central (Liu et al. 2006). Não só padrões visuais, mas também na memória visual e na aprendizagem de movimentos para o acasalamento. Estudos com mutantes apontaram que alguns componentes do complexo central, CoS e CoI são necessários para a formação deste tipo de memória (Sitnik 2003).

4.2.2. O complexo central em *Schistocerca gregaria*

O CC de *S. gregária* segue a divisão padrão dos hexápodes: CoI, CoS, PP e NOs (Figura 7). Uma característica do CC neste modelo é a notável estratificação colunar de suas neurópilas, as quais apresentam uma arquitetura modular, caracterizada por fileiras de 16 colunas de fibras neuronais, interseccionadas no Co por camadas horizontalmente dispostas (Homberg 2008).

Do ponto de vista neuroanatômico, o CC do gafanhoto apresenta também um padrão característico de cruzamento das fibras neuronais que conectam suas neurópilas (Heinze e Homberg 2008). Estes quiasmas neurais conectam as colunas do Co às colunas da PP, seguindo este padrão de distribuição contralateral. A CoI e a CoS de *S. gregaria* aparentemente não se comunicam através de interneurônios, mas enviam projeções para o LAL através de neurônios com arborizações em ambas as subunidades. Além disso, muitos destes neurônios também apresentam arborizações na PP. Embora a complexa rede de ramificação destes neurônios que inervam o LAL dificulte conclusões precisas sobre suas polaridades sinápticas, os autores sugerem que os mesmos seriam vias majoritariamente eferentes, a partir do CC (Heinze e Homberg 2008).

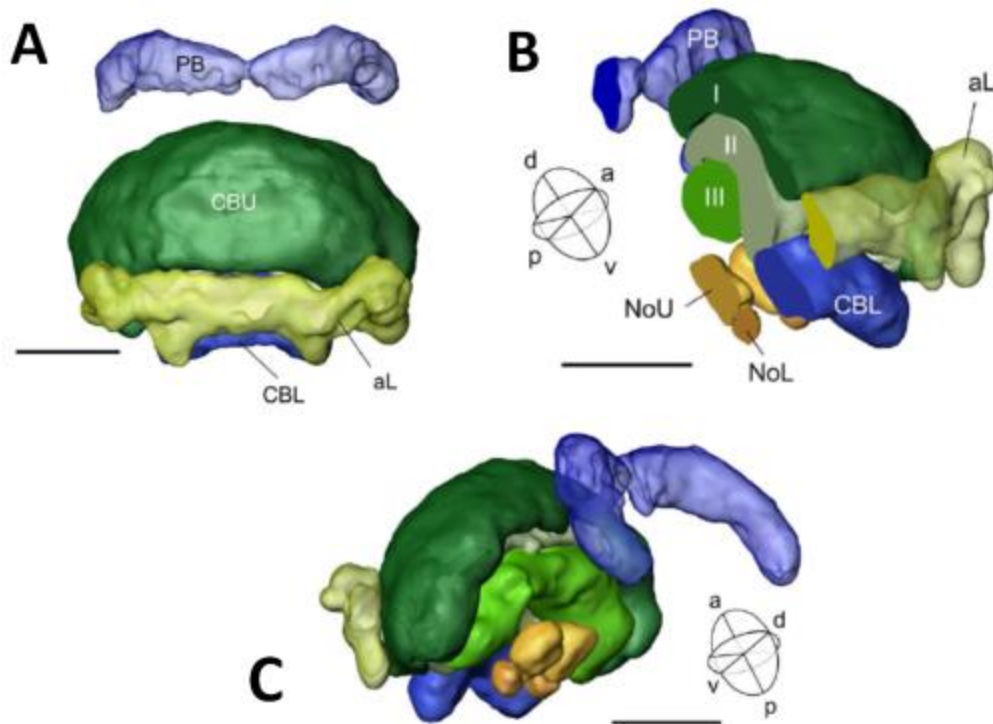


Figura 07 – Diferentes perspectivas do complexo central em *Schistocerca gregaria*. Visão anterior (A), visão em corte dos componentes do CC (B), Visão oblíqua do CC, com ênfase na posição da ponte protocerebral (C). PB – ponte protocerebral; CBU (CoS) – corpo superior; CBL (CoI) – corpo inferior; NoU – divisão superior do nódulo; NoL – divisão inferior do nódulo; aL – lábio anterior. Retirado de Heinze e Homberg 2008.

Parte representativa dos neurônios registrados eletrofisiologicamente no CC do gafanhoto do deserto apresentam respostas de sensibilidade à luz polarizada, quando este estímulo é apresentado dorsalmente. O padrão de luz polarizada no céu é uma pista visual explorada pelos insetos durante a navegação, servindo como referência de orientação em relação à posição relativa do sol (Vitzthum 2002, Homberg 2009). Os principais neurônios tangenciais do CoI e da PP, assim como todos os neurônios registrados com ramificações na PP são sensíveis a polarização da luz (Homberg 2009). Estes dados revelam a participação de duas subdivisões do CC no processamento da luz polarizada: o CoI e a PP (Homberg 2009). Não só a mera participação de tais neurônios na codificação da informação provinda da polarização da luz, mas todo um arranjo neuroanatômico parece estar relacionado à ativação destes neurônios (Pfeiffer et al. 2007). O arranjo colunar específico destas neurópilas representa uma codificação espacial da luz polarizada em diferentes orientações, funcionando como uma espécie de bússola para navegação (Heinze e Homberg, 2009, Pfeiffer et al. 2007).

Além disso, atividades neuronais foram registradas durante a manipulação das asas e durante o voo, o que sugere que o complexo central também possua participação no processamento proprioceptivo e de controle de voo (Homberg, 2008).

Evidências apontam que o complexo central desempenha uma função crucial na orientação espacial e reconhecimento de objetos no espaço (Homberg, 2008).

Do ponto de vista neuroanatômico, o complexo central do gafanhoto apresenta também um padrão de cruzamento de fibras neuronais, como também observado na mosca-da-fruta (Heinze e Homberg 2008). Nestes arranjos, a PP conecta-se com as divisões do corpo central, seguindo este padrão de distribuição heterolateral. As subunidades do Co aparentemente não se comunicam, mas enviam projeções para o LAL, além de já apresentarem arborizações na PP. Ainda de acordo com os autores, estes neurônios que inervam o LAL seriam vias eferentes, a partir do CC (Heinze e Homberg 2008).

4.2.3. O complexo central de *Apis mellifera*

Pouco se sabe sobre a organização neural do CC na abelha doméstica. Segundo estudos neuroanatômicos sobre a organização geral do cérebro da abelha (Brandt et al. 2005), o CC é também dividido em três compartimentos bem definidos: o corpo central (Co), a ponte protocerebral (PP) e um par de nódulos (NO). Embora essa compartimentalização esteja clara, do ponto de vista morfológico, a conectividade e a função dos circuitos neuronais envolvendo o CC permanecem obscuras. Em 1979, Guy e colaboradores descreveram um trato (trato ocelar) de neurônios gigantes de segunda ordem (axônios de 8,0um a 12,0um de espessura) associados a neurônios menores que descendem dos ocelos e apresentam arborizações na PP de abelhas. Este dado sugere que a PP de abelhas esteja envolvido, em parte, no processamento visual a partir dos ocelos (Guy 1979).

Segundo a extensiva revisão realizada no presente estudo, apenas três trabalhos descreveram aspectos anatômicos e fisiológicos de neurônios com arborização no CC de abelhas: Guy (1979), Homberg et al. (1985) e Milde et al. (1988). Todos estes trabalhos realizaram registros eletrofisiológicos intracelulares de neurônios do protocérebro medial, seguido da identificação anatômica dos neurônios registrados com uso de traçadores. Foram utilizados estímulos sensoriais simples durante os registros, tais como luz produzida a partir de lâmpada incandescente, de forma estacionária e intermitentes (visual); odores florais (olfativo); solução açucarada (gustativo) e jatos de ar (mecânico).

A tabela 01 (página 30) categoriza os 23 neurônios (16 registrados por Homberg, 06 registrados por Milde e 01 registrado por Guy) descritos nestes trabalhos e indica quais as áreas de inervação, muito embora não seja possível concluir qual a polaridade sináptica

de tais neurônios (Homberg 1985, Milde 1988). Segundo os autores, a polaridade sináptica destes neurônios não pôde ser determinada a partir das especializações morfológicas típicas observáveis em dendritos e/ou terminais axônicos. Além disso, os complexos padrões de arborização destes neurônios dificultaram a interpretação sobre o sentido de transmissão neural.

Conforme a classificação proposta por Homberg (1985) os 22 neurônios do CC foram divididos em: i) neurônios intrínsecos, que não possuem arborizações fora do CC; ii) neurônios extrínsecos segmentares, que inervam segmentos específicos da PP e do Co, além de inervarem áreas fora do complexo central; iii) neurônios extrínsecos em leque, que apresentam arborizações difusas nas várias colunas do Co (daí o nome atribuído).

A maioria dos neurônios do complexo central registrados eletrofisiologicamente em *Apis mellifera* (tabela 01) apresentaram na sua maioria respostas a mais de uma modalidade sensorial, como indicado abaixo:

- *Dos neurônios intrínsecos* - estímulos luminosos, mecânicos e gustativos. Todos os neurônios apresentaram resposta excitatória após estímulo luminoso do olho ipsilateral. Três outras células apresentaram resposta excitatória após estímulos de movimento do abdômen e água adocicada. Neurônios intrínsecos da PP apresentaram respostas após os seguintes estímulos: luz estacionária, luz em movimento vertical, estímulo mecânico na antena esquerda e direita, estímulo gustativo na antena (água adocicada). Neurônios intrínsecos com arborizações nos CoI e CoS: respostas excitatórias a estímulos luminosos no olho esquerdo, odor de rosas, jato de ar sobre a cabeça (Homberg 1985).

| Número | CoS | CoI | PP | NO | LAL | POC | APE | TOc | Referência |
|--------|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|--------------|
| 5 | | | X | | | | | | Homberg 1985 |
| 1 | X | | X | | | | | | Homberg 1985 |
| 1 | X | | X | | | | | | Homberg 1985 |
| 4 | X | | | | | | | | Homberg 1985 |
| 1 | X | | X | | X | | | | Homberg 1985 |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|--------------|
| 1 | X | X | | | X | | | | Homberg 1985 |
| 1 | | X | X | | X | | | | Milde 1988 |
| 1 | | | | X* | | | X | | Milde 1988 |
| 1 | | | | X* | | X | | | Milde 1988 |
| 1 | | | X | | | X | | | Milde 1988 |
| 1 | | | X | | | | | X | Guy 1979 |
| 1 | X | | | | X | | | | Homberg 1985 |
| 1 | | X | | | X | | | | Homberg 1985 |
| 1 | X | | | | X | | | | Homberg 1985 |
| 2 | X | X | | X** | X | | | | Milde 1988 |

| | |
|-----|----------------------|
| Cor | Tipo de neurônio |
| | Intrínseco |
| | Extrínseco segmentar |
| | Extrínseco em leque |

Tabela 01: Tipos de neurônios e os sítios de ramificação no complexo central (regiões intrínsecas) e outras regiões (extrínsecas). Azul: neurônios intrínsecos; rosa: neurônios extrínsecos segmentares; verde: neurônios extrínsecos em leque. CoS – Corpo central superior; CoI – corpo central inferior; PP – Ponte protocerebral; NO – nódulo; LAL – Lobo acessório lateral; Oc – ocelo; APE – área periesofágial; POC – comissura óptica posterior. TOc Trato ocelar* apenas nódulo direito; ** ambos os nódulos

- *Dos neurônios extrínsecos segmentares*– visual, olfativo, mecânico, gustativo. Neurônios com arborizações ipsilaterais na PP, na CoS e no LAL contralateral apresentaram respostas excitatórias a: luz frontal, odor de rosa, estímulo mecânico (jato de ar na cabeça e abdômen), e toque de gota de água nas antenas. Neurônios com arborizações na PP, no CoI e LAL: estímulo luminoso do olho esquerdo, estímulo mecânico na cabeça (Homberg 1985). Neurônios com inervação no nódulo direito e na neurópila periesofágial apresentaram resposta excitatória a estímulos luminosos. Neurônio que inerva a PP e a POC apresentou resposta excitatória a estímulos visuais apresentados aos ocelos (luz branca). Neurônios com arborizações na PP e no CoI responderam simultaneamente a estímulos visuais e mecânicos, mas não responderam a estes estímulos de forma segregada, sendo que para o componente visual, pouco importou se a via de entrada fora os ocelos, os olhos compostos ou ambos (Milde 1988). O neurônio que faz conexão entre o trato ocelar e a PP apresentou resposta excitatória a partir de estímulo luminoso dos ocelos (Guy 1979).

- *Dos neurônios em leque* – visual, mecânico e gustativo. Não se observou resposta excitatória à luz estacionária e estímulos mecânicos. Apresentou resposta excitatória diante de luz em movimento, indo em direção ao olho. Neurônio com arborizações na CoS: resposta excitatória para estímulos mecânicos na cabeça e tórax; toque de água adocicada na antena direita (Homberg 1985). Dois neurônios apresentavam arborizações em ambos os nódulos, corpo central e LAL. A iluminação dos ocelos causou atividade inibitória. Estímulos luminosos em movimento desencadearam resposta de inibição para a direção postero-anterior e excitação para a direção antero-posterior (Milde 1988).

Trabalhos mais recentes sobre a conectividade de circuitos neuronais no protocérebro visual de abelhas demonstraram que alguns neurônios provenientes do TOA possuem terminais em áreas do LAL que se conectam diretamente ao CC (Mota et al. 2011).

Os dados apresentados nos estudos acima descritos revelaram características de neurônios do CC de forma individualizada e isolada de um contexto maior. Dessa forma, estudos neuroanatômicos e neurobiológicos complementares ainda são necessários para obter conclusões mais concretas sobre a arquitetura neural e as funções do CC no cérebro de abelhas. A seguir iremos apresentar os dados neuroanatômicos obtidos no nosso estudo sobre o CC da abelha.

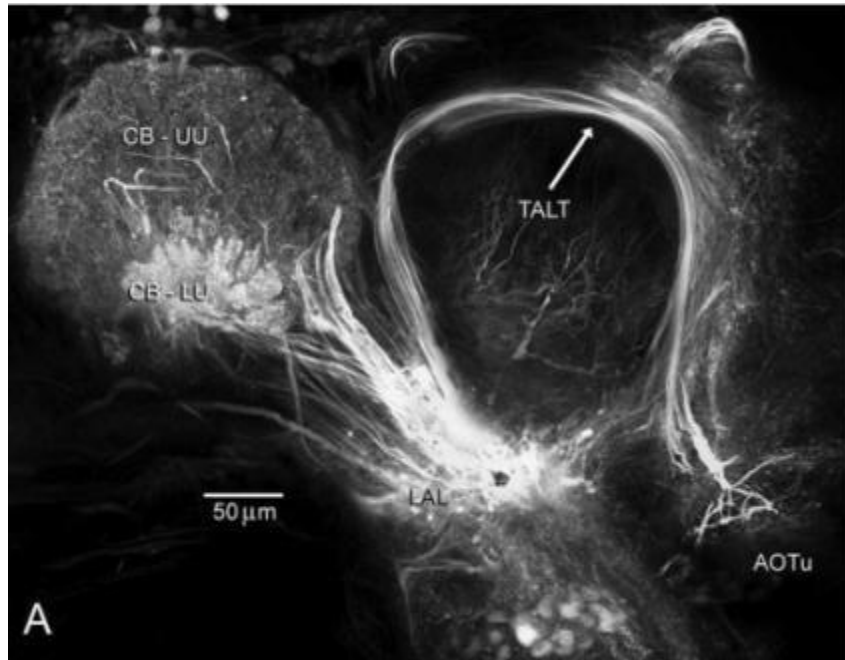


Figura 08 – corte em visão fronta do protocérebro da abelha. Saída do TOA em direção ao protocérebro medial através do trato do tubérculo óptico acessório, TTOA. Injeção de traçador no LAL revela neurônios do TTOA com ramificações dendríticas no TOA, assim como neurônios conectando o LAL com o CoI e CoS. Adaptado de Mota et al. 2011). Correspondência das siglas em inglês: *TALT* – TTOA; *AO Tu* – TOA; *CB-UU* – CoS; *CB-LU* – CoI.

4.3. Análise das preparações histológicas do cérebro de *Apis mellifera* em microscopia óptica.

4.3.1. Localização geral do complexo central no protocérebro medial

O complexo central (CC) de *Apis mellifera*, localiza-se na porção centro-medial do protocérebro, entre os pares de corpos pedunculados (CPs) e os dois lobos acessórios laterais (LAL) dos dois hemisférios cerebrais (Figura 09). Em preparações histológicas coradas por tetróxido de ósmio (Figura 09), pode-se observar as neurópilas no CC bem definidas por folhetos gliais. Cabe ressaltar que o CC representa uma das poucas estruturas cerebrais no cérebro da abelha que não possui um elemento em cada hemisfério cerebral, sugerindo fortemente uma participação em processos de integração sensorial.

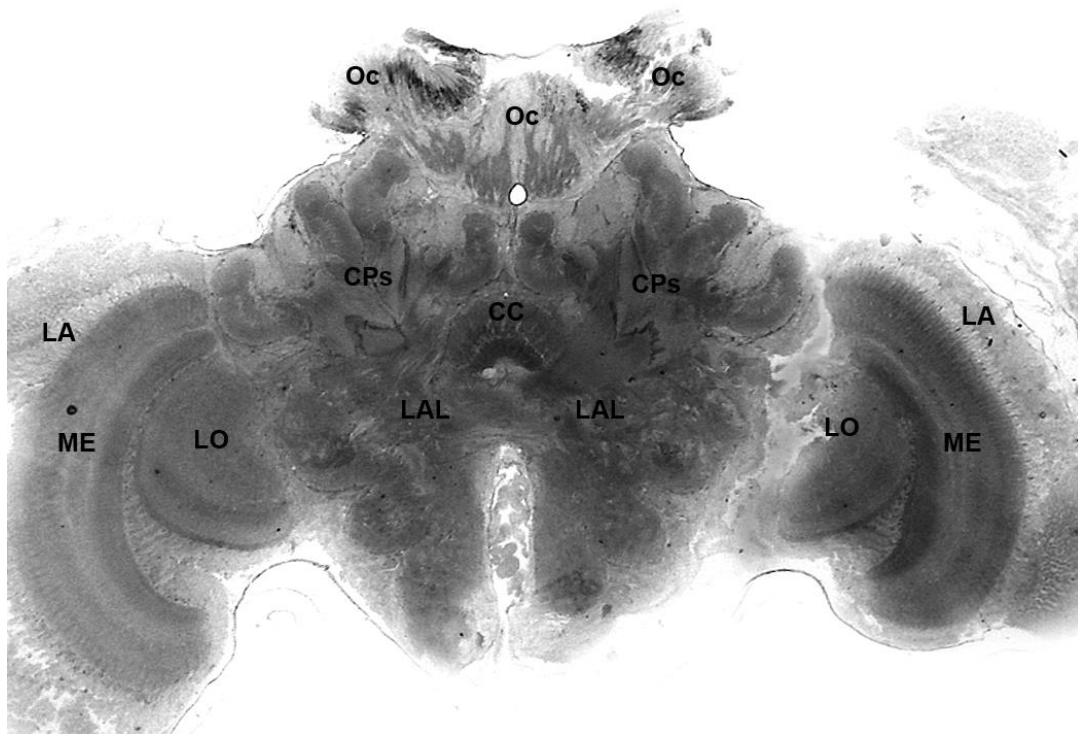


Figura 09 – Corte frontal do cérebro de *Apis mellifera* corado com tetróxido de ósmio (OsO₄), no aumento de 40x. Percebe-se a localização do complexo central na porção medial do protocérebro, acompanhando a linha medial do cérebro. Abreviações: CC: complexo central; CP: corpo pedunculado; ME: medula; LO: lóbula; LA: lâmina; LAL: lobo acessório lateral; Oc: ocelo.

4.3.2. A compartimentalização e a sub-compartimentalização do complexo central

Assim como nos outros modelos de insetos hexápodes analisados, o complexo central (CC) da abelha doméstica é dividido em três áreas distintas, dispostas em diferentes porções do protocérebro medial: o corpo central (Co), subdividido em corpo superior (CoS) e corpo inferior (CoI), a ponte protocerebral e um par de nódulos (NO).

A partir dos cortes frontais corados por ósmio, foi possível estabelecer a localização relativa e a profundidade de cada um dos subcomponentes no eixo antero-posterior (direção dos cortes realizados para a análise). De acordo com a Figura 10, pode-se observar que o primeiro subcompartimento que surge na sequência de cortes, a partir de ~ 85 µm de profundidade é o CoS (Figura 10 A). À medida que os cortes avançam no eixo antero-posterior, observamos o aparecimento do CoI, ventralmente à face côncava do Cos, na profundidade de ~ 105 µm (Figura 10 B). Ambos compartimentos do Co possuem um formato similar a um grão de feijão, sendo que o CoS possui área e volume muito maiores que o CoI. A face côncava do CoS apoia a face convexa dorsal do CoI (Figura 11).

Podemos observar nas preparações histológicas, que ambos os compartimentos do Co possuem uma divisão constante em nove colunas, correspondentes entre si (Figura 10 C). A arquitetura destas colunas pode ser claramente observada na porção mais medial do Co, entre ~115 e 145 μm de profundidade no cérebro (Figura 10 C-F).

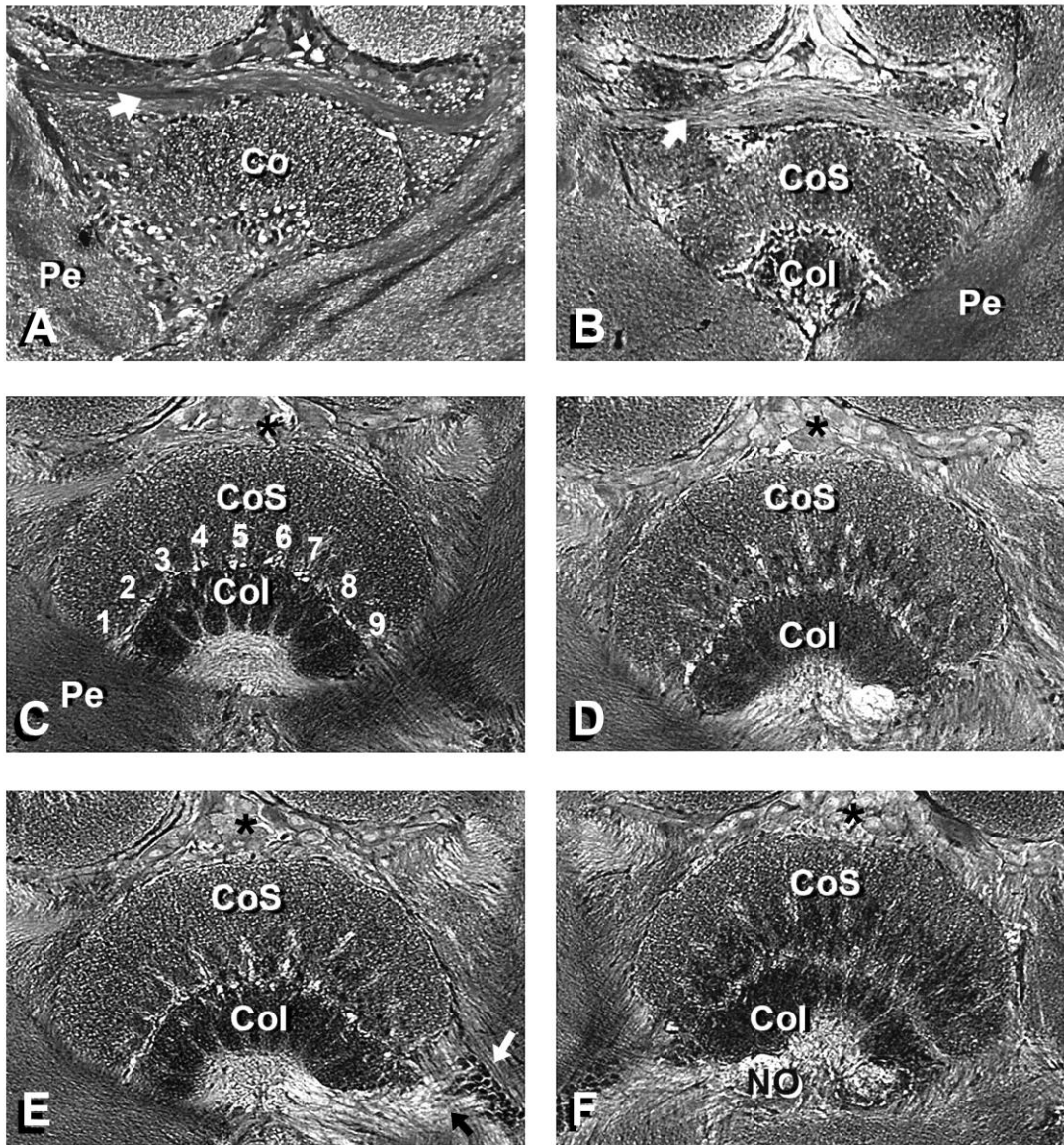


Figura 10 – Sequência de cortes frontais do CC de abelhas corados com teróxido de ósmio, em diferentes profundidades no eixo antero-posterior. A) 85 μm : o CoS surge medialmente entre os pedúnculos dos corpos pedunculados, abaixo de uma proeminente comissura interemisférica (seta branca). B) 105 μm : na linha ventral que delimita o CoS é possível visualizar o aparecimento do CoI. C) 115 μm : é possível visualizar as nove colunas que compõem o CoS e o CoI. D) 125 μm : pequenos elementos circulares eletrodensos podem ser observados na porção mais ventral das colunas do CoS, sugerindo a presença de especializações sinápticas nesta região. Estes elementos também podem ser evidenciados nos cortes E e F. E) 135 μm : a seta branca indica a presença de grandes botões sinápticos no LAL, a partir dos quais podemos observar fibras que comunicam esta região com o Co (seta preta). F) 145 μm : neste último corte, os nódulos começam a aparecer ventralmente com o gradativo desaparecimento da CoI. Os asteriscos em C-D indicam a presença de corpos celulares com grande probabilidade de serem de neurônios intrínsecos e extrínsecos do CC (Homberg 1985). Abreviações: CoI: corpo inferior, CoS: corpo superior, LAL: lobo acessório lateral; NO: nódulo, Pe: pedúnculo.

A análise dos cortes nos leva a concluir que o CoI não apresenta aspecto maciço como observado em *Schistocerca gregaria* (Homberg 2008), mas assemelha-se mais ao CoI da mosca drosófila (Strauss 2002), com uma perfuração central e incompleto na face posterior, interligado aos nódulos. Com o avanço dos cortes no eixo antero-posterior, o CoI começa a diminuir e progressivamente vai dando lugar aos nódulos (NOs), únicas neurópilas pareadas do complexo central (Figuras 10F e 11 A, B e C).

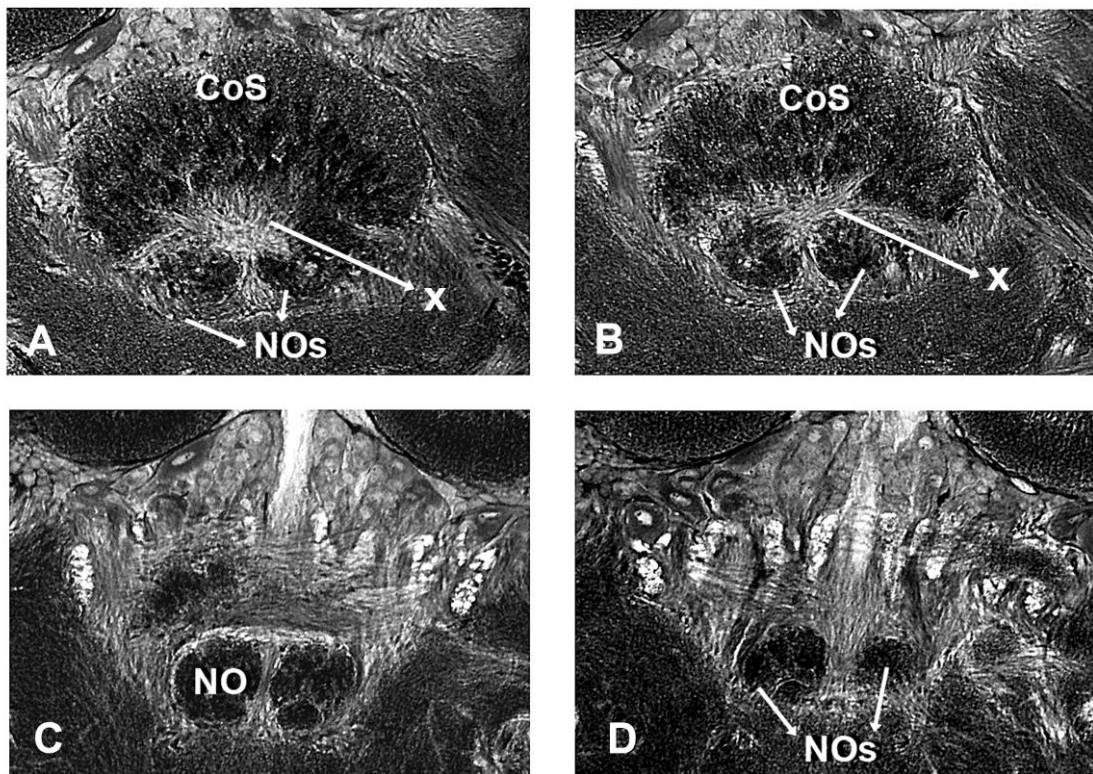


Figura 11 – Sequencia de cortes de 10 μ m mostrando o desaparecimento do Co e o surgimento dos NOs. A) 155 μ m: presença de um quiasma lateral (X) inervando os NOs e o CoS. B) 165 μ m: entre os NOs, percebe-se a presença de fibras transversais trocando a informação lateralmente da direita para a esquerda, e vice-versa. C) 175 μ m: desaparecimento do CoS e aparecimento de feixes segregados de fibras originados nos corpos celulares na região dorsal. É possível, nesta orientação do corte, perceber que os nódulos são subcompartimentalizados em terços (divisões visíveis no NO esquerdo, à direita da foto). D) 185 μ m: um conjunto de nove feixes de fibras descendentes bem segregadas originadas dos grandes corpos celulares dorsais pode ser observada no nível onde os NOs começam a desaparecer. Abreviações: CoS: corpo superior, NOs: nódulos.

Os cortes frontais corados com ósmio nas profundidades entre ~155 e 165 μ m (Figura 11 A e B, respectivamente) revelaram a existência de um quiasma conectando os NOs ao CoS. Aparentemente, esse quiasma lateral envia informações do NO direito para o lado esquerdo do CoS, enquanto a informação proveniente do NO esquerdo é enviada para o lado direito do CoS (Figura 11 A e B). Assim como em gafanhotos, é possível perceber uma divisão dos nódulos, a partir do plano de corte aplicado (Homberg 2008).

Aparentemente, os nódulos são divididos em três subcompartimentos (Figura 11 C, ~175 μ m). Esta divisão em terços será mais explorada na discussão deste trabalho. Entre 175 e 185 μ m de profundidade (Figura 11 C-D), podemos observar que as projeções originadas dos grandes corpos celulares presentes na região dorsal acima do Co (Figuras 11 e 12) são segregadas em feixes de fibras. Em nossas preparações, foi possível contar um total de aproximadamente nove feixes de fibras segregados (Figura 11 D, ~185 μ m), o que curiosamente parece corresponder ao número de colunas da estratificação do Co (Figura 11 C).

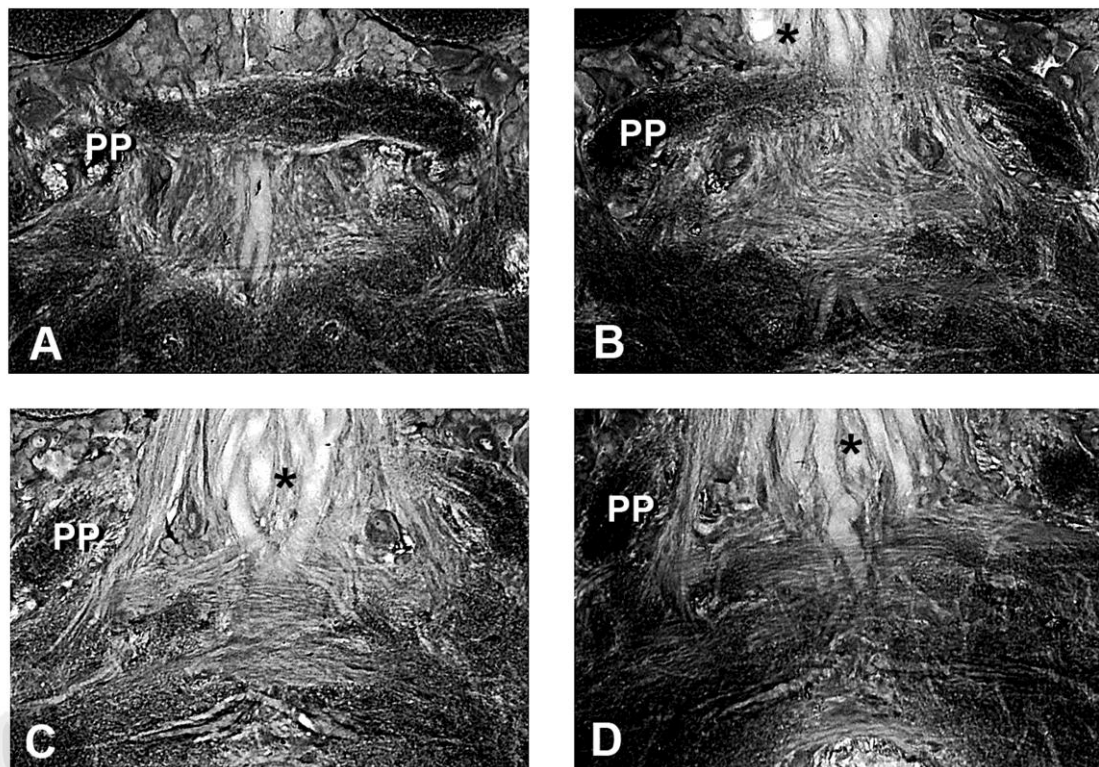


Figura 12 – Sequência de cortes de 10 μ m revelando na porção posterior do complexo central, a ponte protocerebral (PP). Neste nível, CoS, CoI e NO já desapareceram. A) 195 μ m: a extensão medial da PP é a primeira a aparecer. B-C) 205-215 μ m: extremidades laterais da ponte protocerebral são arqueadas ventralmente. Medialmente, na região dorsal acima da PP, pode-se perceber o surgimento do trato ocelar (asteriscos), proveniente dos ocelos e perpendicular ao plano da PP. D) 225 μ m: Porção final da PP, marcada por suas extremidades em cada lado da figura. Alguns neurônios do trato ocelar (asterisco) parecem arborizar lateralmente na PP. Abreviações: PP: ponte protocerebral.

Após o desaparecimento do CoS e dos NO, surge a ponte protocerebral (PP), estrutura cilíndrica alongada lateralmente, perpendicular ao plano sagital do cérebro da abelha (Figura 11, 195-225 μ m). A PP possui suas extremidades laterais com uma curvatura simétrica orientada ventralmente (Figura 12 B-D). Posteriormente à PP, observa-se o trato ocelar (Figura 12 B-D), composto por neurônios de grosso calibre com aspecto cristalino,

segundo classificação de Goodman (1977). Alguns destes neurônios arborizam na PP (Guy 1979, Milde 1988), como sugere a Figura 12 D. Aparentemente, a PP não possui subdivisões no eixo antero-posterior.

4.3.3. Conectividade no complexo central revelada por marcações neuronais globais

O conjunto de neurópilas que compõe o CC parece estar intimamente conectado entre si na abelha doméstica (Homberg 1985). Com a análise dos cortes histológicos feitos no nível do CC, procuramos visualizar algumas áreas de conexão entre seus compartimentos intrínsecos, assim como conexões extrínsecas com neurópilas vizinhas. Contudo, nossas preparações de marcação global de populações neuronais no cérebro não nos permitem tirar conclusões precisas sobre a polaridade destas conexões, ou seja, se trazem informação ao CC ou se elas levam informação do CC para outras partes do cérebro da abelha.

Conexões intrínsecas do complexo central – a análise dos cortes histológicos não permitiu que visualizássemos com clareza as conexões intrínsecas entre as neurópilas componentes do CC. Embora algumas destas conexões já tenham sido descritas através de técnicas de eletrofisiologia e marcação intracelular de neurônios individuais (Tabela 01), os dados obtidos permitem tirar poucas conclusões sobre conexões internas do complexo central. A única conexão que se mostrou evidente nas nossas preparações, foi aquela entre os NOs e o CoS, através de um quiasma onde as fibras neurais se cruzam lateralmente (Figura 11 A-B).

Conexões extrínsecas do complexo central – As conexões extrínsecas mais evidentes em nossas preparações coradas com tetróxido de ósmio (Figura 10E), ou ósmio combinado à toluidina (Figura 12), são os tratos neurais conectando o LAL de ambos os hemisférios cerebrais ao Co. Além destas, nossos dados sugerem a existência de arborizações laterais de neurônios descendentes do trato ótico com a PP na porção mais posterior do CC (Figura 12 C-D).

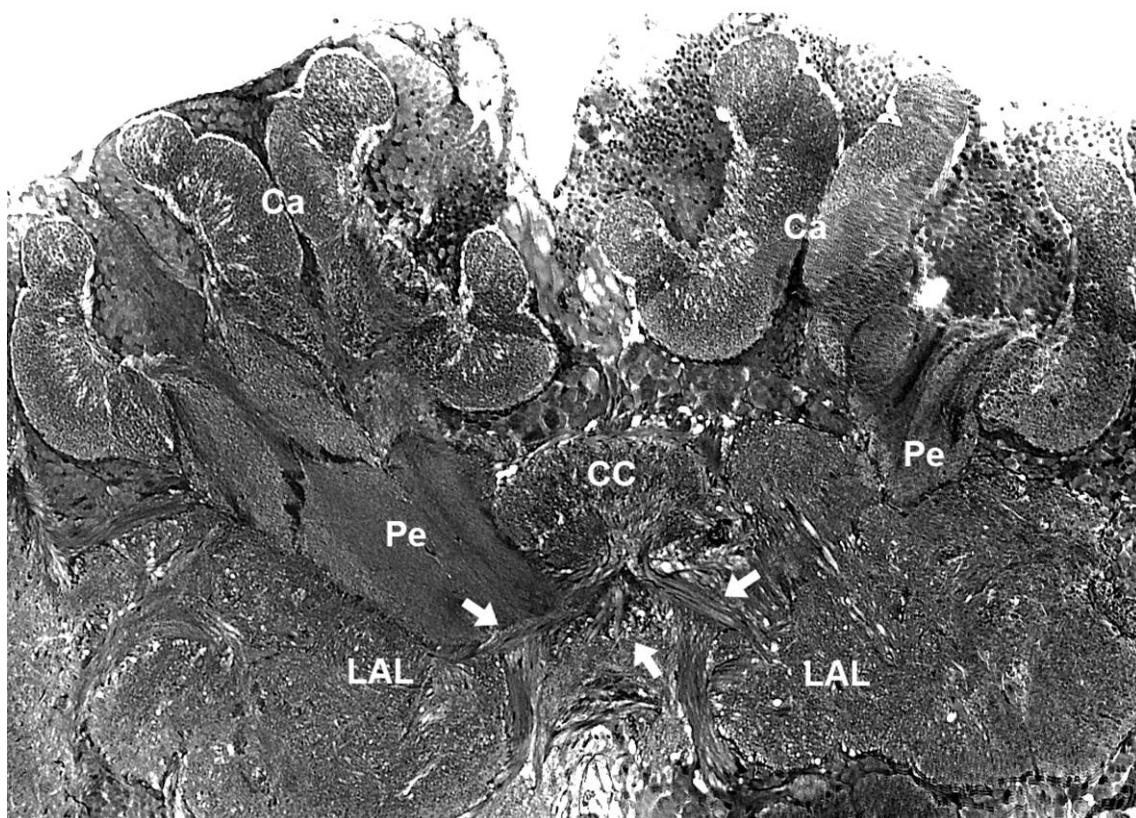


Figura 13: Corte frontal do cérebro corado com teróxido de ósmio e azul de toluidina. Tratos neurais conectam o LAL de ambos os hemisférios cerebrais ao CC. As setas brancas apontam três tratos que convergem para dentro do Co. Aumento de 100x; profundidade ~ 110 μ m. Abreviaturas: LAL: lobo acessório lateral, Pe: pedúnculo do corpo pedunculado, CC: complexo central, Ca: cálice do corpo pedunculado.

4.3.4. Conectividade no complexo central revelada por marcações neuronais específicas

Além das preparações histológicas clássicas descritas acima, buscamos realizar neste estudo injeções específicas de traçadores neuronais fluorescentes (tetrametilrodamina dextran) para tentar revelar características de populações neuronais específicas. A posição centro-medial do CC dificulta a aplicação desta técnica, visto que não é possível visualizar as neurópilas durante a injeção dos microeletrodos com corante. Mesmo usando coordenadas neurais pré-estabelecidas na porção antero-frontal do cérebro (Mota et al. 2011), apenas duas de nossas preparações foram bem sucedidas em aplicar o corante especificamente em uma única neurópila (Figura 14).

Na primeira preparação, o traçador foi injetado em uma das colunas no CoI (Figura 14A), revelando arborizações nas demais colunas desta estrutura, em praticamente toda a estrutura no CoS, assim como no LAL (principalmente no LAL direito). Na segunda

preparação, o traçador foi injetado em uma pequena área na extremidade direita do CoS (Figura 14B), revelando arborizações em toda a porção anterior desta estrutura, em todas as colunas do CoI, e no LAL (principalmente no LAL direito). Estes dados sugerem que o CoI e o CoS estão fortemente conectados entre si (conexões intrínsecas). Além disso, conexões com o LAL (conexões extrínsecas) confirmam nossas observações anteriores. . Em ambas as preparações (Figura 14A-B) observamos finas ramificações e pequenas varicosidades no CoI, CoS e LAL. A presença simultânea desses aspectos morfológicos sugere a existência tanto de especializações dendríticas, quanto axônicas, em todas as estruturas citadas, não permitindo definir populações exclusivamente aferentes ou eferentes.

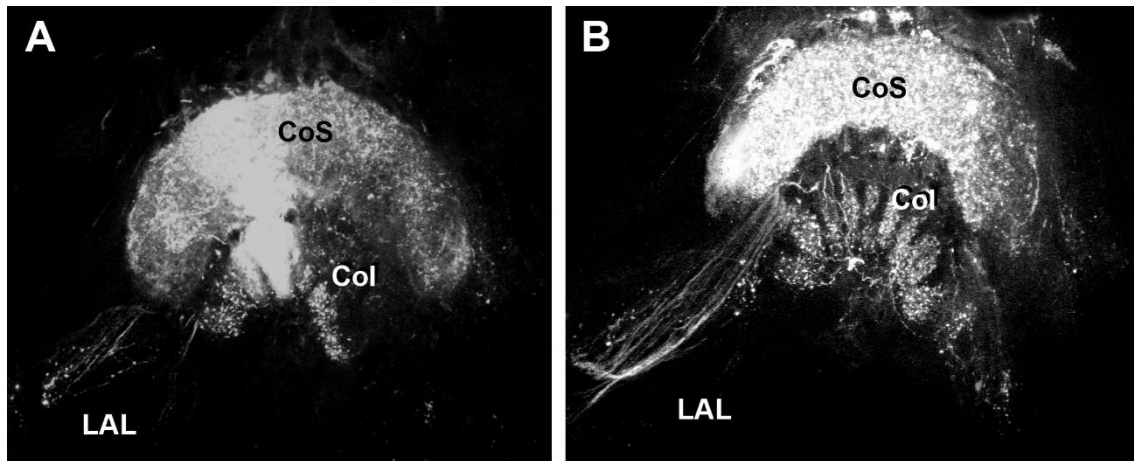


Figura 14 – Microinjeções de tetrametilrodamina dextran no CoI e no CoS da abelha revelam conexões intrínsecas e extrínsecas. A) Injeção específica no CoI revelando arborizações nesta estrutura, no CoS e no LAL. B) Injeção específica no CoS revelando arborizações nesta estrutura, no CoI e no LAL. Em ambas as preparações (A e B) foram observadas pequenas varicosidades e finas ramificações no CoI, CoS e LAL. Cortes de 20 μm ; aumento de 200X, profundidade de $\sim 130\text{-}150\mu\text{m}$. Abreviações: CoI: corpo inferior, CoS: corpo superior, LAL: lobo acessório lateral.

5. Discussão

No presente estudo foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a arquitetura neural e a função do complexo central (CC) no cérebro de invertebrados, especialmente dos insetos hexápodes que hoje são modelos para estudos de neurobiologia (*D. melanogaster*, *S. gregaria* e *A. mellifera*). Os poucos dados existentes na literatura sobre a morfologia e a conectividade de neurônios isolados do CC de *Apis mellifera* foram cuidadosamente analisados e organizados em uma tabela. Além disso, analisamos e compilamos os poucos resultados sobre registros eletrofisiológicos intracelulares destes neurônios. Finalmente, realizamos marcações neuronais globais e específicas no CC de *Apis mellifera*, visando

estudar com maiores detalhes a arquitetura neural e a conectividade desta estrutura. Após a análise dos nossos dados neuroanatômicas e a comparação destes dados com o restante da literatura avaliada, diversos aspectos interessantes podem ser levantados, como apresentaremos a seguir.

5.1. Semelhanças e diferenças na arquitetura neural do CC em *Apis mellifera* e outros modelos hexápodes

Nosso estudo neuroanatômico permitiu uma descrição detalhada da compartimentalização do CC em *Apis mellifera*, revelando não apenas a presença dos compartimentos clássicos já descritos na literatura (Co: CoI/CoS, NO e PP; Homberg et al. 1985, Milde et al. 1988, Brandt et al. 2005), mas também as subdivisões de cada um destes compartimentos.

Vimos inicialmente que ambos o CoI e o CoS possuem uma estratificação em nove colunas, sendo que cada coluna do CoI, apresenta um correspondente na CoS (Figura 10 C-D). Um padrão similar de estratificação colunar também é observado em *D. melanogaster* e *S. gregaria*, porém o número destas colunas observadas no eixo antero-posterior varia significativamente entre as espécies: 16 colunas para o gafanhoto do deserto (Heinze e Homberg 2008) e 08 para a mosca drosófila (Strausfeld 1976). Assim, o número de colunas do Co de *A. mellifera* se aproxima mais do número observado em *D. melanogaster*, do que em *S. gregaria*. Este dado, se analisado do ponto de vista evolutivo, tem procedência, uma vez que os grupos *Diptera* e *Hymenoptera* são mais próximos na escala evolutiva que o grupo *Orthoptera*, (Boudreaux 1987). Embora essa inferência evolutiva possa ser feita a partir de nossas comparações, este dado de forma isolada não pode ser considerado como uma evidência evolutiva, antes que vários outros grupos sejam incluídos na análise morfológica do CC.

Os neurônios descritos por Homberg e Milde (1985 e 1988, respectivamente) com arborizações em forma de leque no CoI e/ou CoS de *A. mellifera* (Tabela 01) acompanham a estratificação colunar destas estruturas. Essa mesma categoria de neurônios pôde ser observada nas injeções específicas de traçadores neuronais que realizamos no CoI e no CoS (Figura 14). Ao contrário dos neurônios em leque, que arborizam em praticamente todas as colunas do Co e provavelmente integram a

informação entre estas colunas, os neurônios descritos como segmentares (Tabela 01) restringem suas arborizações a colunas específicas nas neurópilas do CC. Isso indica que parte da informação processada no CC de abelhas é segregada em divisões específicas, enquanto outra parte é integrada entre essas divisões, ressaltando assim o valor do CC como substrato neuronal para estudos da segregação e integração de estímulos sensoriais.

Curiosamente, observamos que na porção mais posterior do CC de abelhas, entre os NOs e a PB, as projeções originadas dos grandes corpos celulares presentes na região dorsal acima do Co (Figuras 11 e 10) são segregadas em nove feixes de fibras (Figura 11 D). Embora não possamos a partir de nossas preparações confirmar a inervação destes neurônios no CC, a coincidência entre o número de feixes de fibras e o número de colunas do CoI e CoS sugere fortemente uma relação conectiva destes neurônios com o CC. Além disso, Homberg (1985) demonstra que alguns neurônios intrínsecos registrados no CC de abelha apresentavam seus corpos celulares justamente nesta região dorsal, chamada de *pars intercerebralis* Em *S. gregaria*, feixes de fibra segregadas de maneira similar e localizadas na mesma região, participam na conexão entre colunas específicas do Co e da PB (Heinze & Homberg 2008, 2009). Provavelmente, este também é o caso em *A. mellifera*.

Outras estruturas nas quais encontramos subdivisões bem marcadas foram os nódulos (NOs). Nossos estudos demonstram que os NO da abelha apresentam três subdivisões (Figura 11 C-D) quando avaliados no plano antero-posterior. Em *S. gregaria* foi demonstrado que os NOs apresentam quatro subdivisões (Heinze & Homberg 2008), sendo que cada divisão é inervada por um tipo de fibra neural (Figura 8). Já os NOs da drosófila apresentam apenas duas subdivisões bem definidas (Strauss 2002). Nos nossos cortes frontais do cérebro de abelha, a análise da PB no sentido antero-posterior não revelou subdivisões nítidas nesta estrutura. Este dado é curioso, visto que em cortes similares do cérebro de *D. melanogaster* (Figura 5, Strauss 2002) e *S. gregaria* (Figura 8, Heinze and Homberg 2008), podem ser observadas colunas, cujo número corresponde ao número de colunas do Co. A ausência de subdivisões na PB de abelhas ainda precisa ser confirmada com outros tipos de marcação histológicas e cortes em distintos eixos de orientação do cérebro, mas sem dúvidas esta estrutura não apresenta subdivisões tão bem definidas como as observadas na mosca drosófila e no gafanhoto.

5.2. Estudo comparativo da conectividade do CC de abelhas e outros modelos

Ao contrário de outros modelos mais amplamente estudados, como o gafanhoto-do-deserto, no qual muito se sabe sobre a polaridade sináptica dos neurônios participantes do CC (Heinze e Homberg, 2008, 2009, Pfeiffer e Homberg 2007), pouco ou quase nada se sabe ainda sobre a dinâmica de entrada e saída de sinais no CC da abelha. Embora os dados compilados sobre a morfologia de 23 neurônios registrados no CC da abelha (Tabela 01) demonstre a existência de conexões intrínsecas e extrínsecas, estes estudos não puderam tirar conclusões precisas sobre a polaridade dos mesmos (Guy 1979, Homberg 1985 e Milde 1988). Os autores destes estudos ressaltaram que os complexos padrões de arborização dos neurônios, combinado à presença de especializações sinápticas que não permitem definir dendritos e terminais axônios com clareza, dificulta o estudo da polarização sináptica nos neurônios do CC. A mesma dificuldade foi também encontrada no nosso estudo.

No intuito de superar esta dificuldade, outros estudos realizados em nosso laboratório vêm buscando utilizar uma técnica de imunohistoquímica que permite avaliar a porção pré e pós-sináptica (anticorpos anti-faloídina e anti-sinapsina) dos circuitos neuronais envolvendo o CC (Figura 15 A). Através desta técnica foi possível observar que os conspícuos botões sinápticos que observamos no LAL da abelha (Figura 10 E-F) correspondem a conexões de terminais axônicos de neurônios provenientes do tubérculo ótico anterior (TOA) com neurônios pós-sinápticos tangenciais que inervam o Co (Figura 15 B-C). Estas conexões microglomerulares se distribuem em dois *clusters* de microglomérulos em cada hemisfério cerebral (Figura 15 B). No gafanhoto *S. gregaria* estes mesmos *clusters* correspondentes de microglomérulos sinápticos foram identificados (Traguer et al 2008). Neste modelo, as conexões aferentes entre o TOA, o LAL e o CC fornecidas por essas particulares sinapses, apresentam transmissão do tipo GABAérgica (Traguer et al 2008).

Outro aspecto interessante que vem sendo investigado nas preparações imunohistológicas, é o fato de existirem muito menos neurônios pré-sinápticos no CoI do que no CoS de abelhas (Figura 15 D). Outro fato interessante é a constituição dos NOs, que parecem ser preenchidos por botões sinápticos bem definidos (Figura 15 E). No presente estudos observamos a existência de um proeminente quiasma lateral entre os NOs e o Co de abelhas (Figura 11 A-B), cujas fibras neurais provavelmente se relacionam

a estes botões sinápticos. Em *S. gregaria* (Heinze & Homberg 2008), um quiasma similar foi observado na porção posterior do Co, e denominado quiasma anterior.

Assim como o estudo de Guy (1979), nosso estudo sugere a existência de conexões entre a PP e o trato ocelar (Figura 12). Este trato composto por neurônios de grosso calibre participa não apenas da transmissão da informação proveniente do ocelo ao cérebro, mas também parece ser uma importante via de integração visuo-motora da abelha (Guy 1979, Milde 1988, Ribí et al. 2011).

5.3. Possíveis funções do CC de abelhas no processamento sensorial

O complexo central tem sido atribuído a várias funções, em diferentes modelos, com especial participação no processamento visual de ordem superior e na integração visuo-motora. Foi demonstrado o envolvimento desta estrutura no controle motor em drosófila e baratas (Strauss 2002, Bender 2010), na memória visual em drosófila (Liu et al. 2006, Sitnik et al 2003) e no processamento de luz polarizada em gafanhotos e grilos (Pfeiffer et al. 2007; Heinze et al 2009). Acreditamos que o CC da abelha doméstica também possa compartilhar destas funções, uma vez que várias semelhanças neuroanatômicas foram encontradas no nosso estudo comparativo. Evidências para a participação do CC de abelhas na integração visuo-motora são as conexões observadas entre a PP e o trato ocelar, uma via importante neste tipo de processamento. Outro fato interessante, que sugere a participação do CC de abelhas no processamento de luz polarizada são os complexos microglomerulares observados no LAL que conectam o TOA ao CC. Em *S. gregaria* esta via neuronal representa uma das principais vias de processamento da luz polarizada (Traguer et al 2008, Pfeiffer et al. 2007). Cabe ainda ressaltar que o CC parece ser não apenas uma estrutura de processamento visual, mas também de integração multissensorial, uma vez que alguns neurônios já registrados nesta região do cérebro (Tabela 01) apresentaram respostas a estímulos de diversas modalidades: visual, olfativa, gustativa e mecanossensorial.

Todas essas inferências sobre a função do CC de abelhas ainda precisam ser confirmadas por estudos neurofisiológicos combinados a estudos comportamentais. Fazem-se necessários, estudos complementares de registro neuronal intracelular com marcação específica, para tentar elucidar a polaridade das células que participam dos circuitos do

CC. Além disso, técnicas de registro extracelular multi-unidade ou registros de cálcio podem fornecer uma visão funcional mais apurada dos circuitos neurais envolvendo o CC. Em estudos futuros, os estímulos sensoriais usados durante os registros neuronais precisam ser refinados para que se chegue a conclusões mais precisas sobre as propriedades de respostas e a função dos neurônios do CC de abelhas, assim como vem sendo feito em *S. gregaria* (Vizthum et al. 2002, Pfeiffer et al. 2005 e 2007, Homberg et al. 2009). Finalmente, seria extremamente valiosa a aplicação de estudos comportamentais combinados a intervenções neurobiológicas no CC, como vem sendo tradicionalmente realizado em *D. melanogaster* (Strauss 2002, Sitnik et al. 2003, Liu et al. 2006).

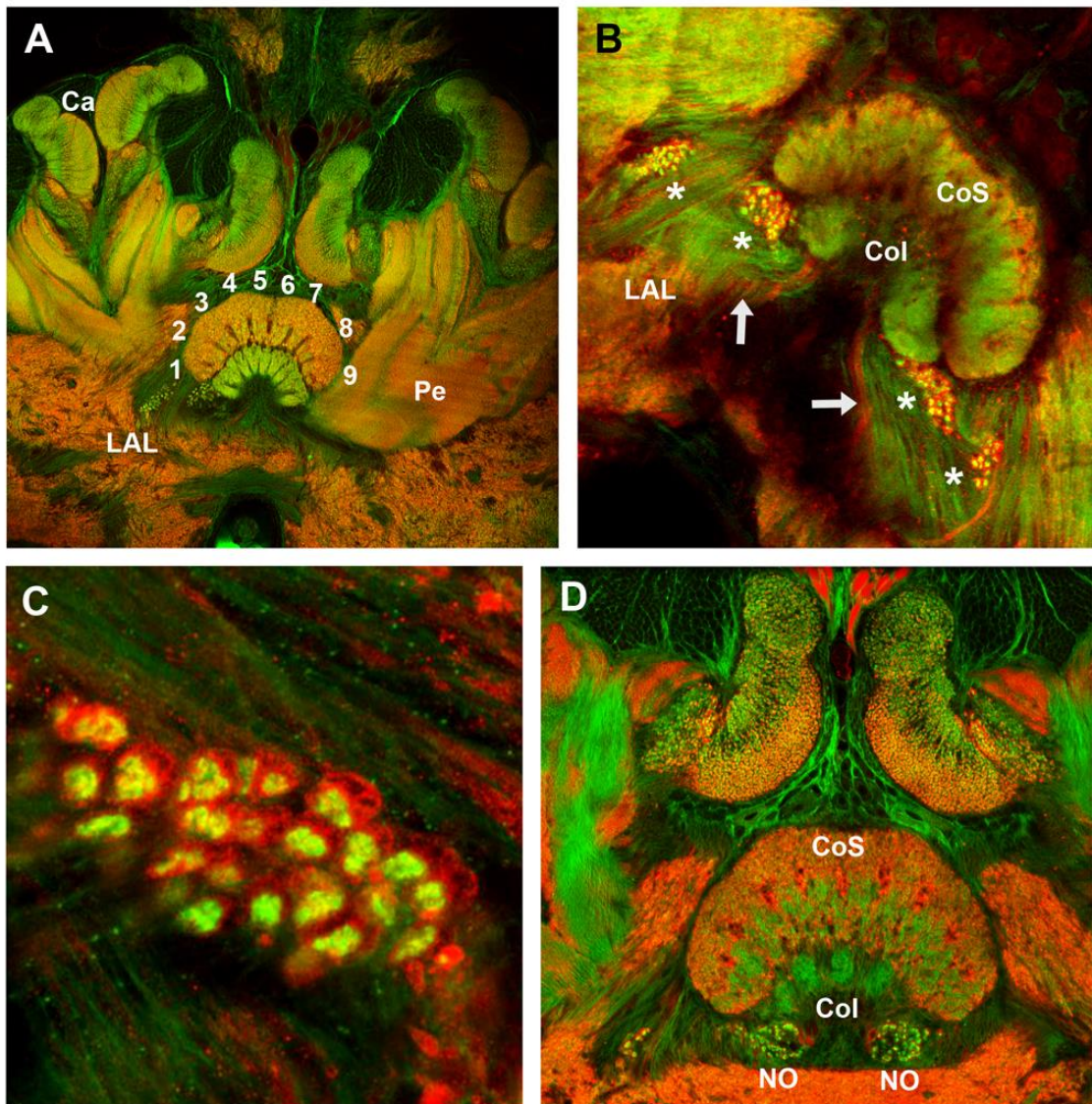


Figura 15: Marcação da porção pré- e pós-sináptica dos circuitos neurais do CC de *A. mellifera* com anticorpos específicos. A parte pré-sináptica está marcada em vermelho, enquanto a pós-sináptica está marcada em verde. A) Vista global da marcação imunohistoquímica, revelando com clareza as nove colunas

do CoI e CoS. B) Dois clusters de largos microglomérulos sinápticos podem ser observados no LAL de ambos os hemisférios cerebrais (asteriscos). As setas indicam tratos neuronais tangenciais conectando o LAL ao Co. C) Microglomérulos sinápticos no LAL. Largos elementos pré-sinápticos (vermelho) abrigam pequenas varicosidades de elementos pós-sinápticos. D) O CoS parece apresentar uma estrutura pré-sináptica (em vermelho) muito mais desenvolvida que o CoI. Os dois NOs do CC de abelhas são constituídos por pequenos botões sinápticos. Abreviações: LAL: lobo acessório lateral, Pe: pedúnculo do corpo pedunculado, CoS: corpo superior, CoI: corpo inferior, NO: nódulo.

6. Referência bibliográfica:

Backhaus W (1991) Color opponent coding in the visual system of the honeybee. *Vision Res* 31(7-8) : 1381-1397.

Benard J, Giurfa M (2008) The cognitive implications of asymmetric color generalization in honeybees. *Anim Cogn* 11(2): 283-93.

Bicker G, Schäfer S, Rehder V (1987) Chemical neuroanatomy of the honeybee brain. In *Neurobiology and behavior of honeybees* (Menzel R and Mercer A, Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Boudreaux, H. B. (1987) *Arthropod phylogeny: with special reference to insects* 320.

Bowmaker JK (1991) Evolution of photoreceptors and visual pigments. In *Evolution of the Eye and Visual Pigments* (Cronly-Dillon JR and Gregory RL, Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 63-81.

Boyan G, Williams L, (2011) Embryonic development of the insect central complex: Insights from lineages in the grasshopper and *Drosophila* - *Arthropod Structure & Development* 40 (2011) 334-348

Callaway EM (2005) Structure and function of parallel processing pathways in the primate early visual system. *J Physiol (Lond)* 566:13-19.

Collett TS, Collett M (2002) Memory use in insect visual navigation. *Nat Rev Neurosci* 3:542-552.

Collett TS, Graham P, Durier V (2003) Route learning by insects. *Curr Opin Neurobiol* 13:718-725.

Daumer, K. (1956). Reizmetrische untersuchung des Farbensehens der Bienen. *Z. vergl. Physiol.* 38, 413-478.

Douglass JK, Strausfeld NJ (1998) Functionally and anatomically segregated pathways in the lobula complex of a calliphorid fly. *J Comp Neurol* 396:84-104.

Ehmer B, Gronenberg W (2002) Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Neurol* 451:362-373.

Gribakin FG (1975) Functional morphology of the compound eye of the bee. In: *The compound eye and vision of insects* (Horridge GA Ed.), Clarendon Press, Oxford, pp. 154- 176.

Giurfa M and Menzel R (1997) Insect visual perception: complex ability of simple nervous systems. *Curr Opin Neurobiol* 7: 505-513.

- Giurfa M, Lehrer M (2001) Honeybee vision and floral displays: from detection to close-up recognition. In: Cognitive ecology of pollination (Chittka L, Thomson J Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 61–82.
- Giurfa M, (2003) Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain - Current Opinion in Neurobiology, 13:726–735
- Giurfa M (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. J Comp Physiol A 193: 801-824.
- Goodman LJ, Mobbs PG, Guy RG (1977): Information processing along the course of a visual interneuron. *Experientia* 33, 748-750.
- Gronenberg W (1986) Physiological and anatomical properties of optical input-fibres to the mushroom body in the bee brain. *J Insect Physiol* 32, 695-704.
- Guy RG, Goodman LJ and Mobbs PG (1979) Visual interneurons in the bee brain: synaptic organisation and transmission by graded potentials. *J. comp. Physiol.* 134, 253-264.
- Hanesch U, Fischbach KF, Heisenberg M (1989) Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res*, 257:343-366.
- Hertel H (1980) Chromatic properties of identified interneurons in the optic lobes of the bee. *J Comp Physiol* 137: 215-231.
- Hertel H, Schäfer S, Maronde U (1987) The physiology and morphology of visual commissures in the honeybee brain. *J Exp Biol* 133: 283-300.
- Holmgren N (1916) Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychaeten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 56, 1e303.
- Homberg U.(2008) Evolution of the central complex in the arthropod brain with respect to the visual system - *Arthropod Structure & Development* 37 347e362.
- Homberg U (1985) Interneurones Of The Central Complex In The Bee Brain (*Apis mellifera*, L.) - *Joual Insect Physiology*, Vol. 31, no. 3, 251-261.
- Howse P (1975) Brain Structure And Behavior In Insects, *Annual Reviews*.
- Hubel DH, Livingstone MS (1987) Segregation of form, color, and stereopsis in primate area 18. *J Neurosci* 7:3378 -3415.
- Joly R, Descamps M, (1987) Histology and ultrastructure of the myriapod brain. In: Gupta, A.P. (Ed.), *Arthropod Brain: Its Evolution, Development, Structure, and Functions*. Wiley and Sons, New York, pp. 135e157.
- Kien J, Menzel R (1977a) Chromatic properties of interneurons in the optic lobes of the bee. I. Broad band neurons. *J Comp Physiol A* 113: 17-34.
- Kien J, Menzel R (1977b) Chromatic properties of interneurons in the optic lobes of the bee. II. Narrow band and colour opponent neurons. *J Comp Physiol A* 113: 35-53
- Kurylas A, Rohlfig T, Krofczik S, Jenett A, Homberg U, (2008) Standardized atlas of the brain of the desert locust, *Schistocerca gregaria* - *Cell Tissue Res* 333:125–145
- Loesel R, Nässel D, Strausfeld N, (2002) Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods - *Arthropod Structure & Development* 31 77–91

- Liu G, Seiler H, Wen A, Zars T, Ito K, Wolf R, Heisenberg M, Liu L, (2006) Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain – Nature 439|2, 10.1038/04381
- Marks WB, Dobbelle WH, Macnichel EF -JR (1964) Visual pigments of single primate cones. Science 143: 1181-1182.
- Mauelshagen J (1993) Neural correlates of olfactory learning in an identified neuron in the honey bee brain. J Neurophysiol 69: 609-625.
- Menzel R (1974) Spectral sensitivity of monopolar cells in the bee lamina. J Comp Physiol A 93: 337-346.
- Menzel R (1985) Learning in honey bees in an ecological and behavioral context. In: Experimental Behavioral Ecology (Hölldobler & Lindauer Eds.), Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 55-74.
- Menzel R, Backhaus W (1991) Colour vision in insects. In: Vision and visual dysfunction. The perception of colour. (Gouras P, Ed.), MacMillan, London, pp. 262-288.
- Menzel R, Gaio UC, Gerberding M, Nemrava EA and Wittstock S (1993) Formation of longterm memory in honeybees does not require protein synthesis. Naturwissenschaften 80: 380- 382.
- Menzel R (1999) Memory dynamics in the honeybee. J Comp Physiol A 185: 323-340.
- Menzel R, Manz G (2005) Neural plasticity of mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. J Exp Biol 208: 4317-4332.
- Milde J, (1988) Visual Responses Of Interneurons In The Posterior Median Protocerebrum And The Central Complex Of The Honeybee *Apis mellifera*, Vol. 34, No. 5, 421-436.
- Mobbs PG (1984) Neural networks in the mushroom bodies of the honeybee. J Insect Physiol 30: 43-58.
- Mollon JD (1989) "Tho' she kneel'd in that place where they grew": The uses and origins of primate colour vision. J Exp Biol 146:21 38.
- Mota T, Giurfa M, Sandoz JC (2011). Color Modulates Olfactory Learning in Honeybees by an Occasion-Setting Mechanism. Learning & Memory 18: 144-155.
- Neumeier C (1981) Chromatic adaptation in the honey bee: Successive color contrast and color constancy. J Comp Physiol 144: 543-553.
- Palmer SE (1999) Vision science: Photons to phenomenology. MIT Press, Cambridge.
- Paul K Brown P, Wald G, (1964), Visual Pigments in Single Rods and Cones of the Human Retina, Science, 144- 3614, 45-52
- Paulk AC, Phillips-Portillo J, Dacks AM, Fellous JM, Gronenberg W (2008) The processing of color, motion, and stimulus timing are anatomically segregated in the bumblebee brain. J Neurosci 28: 6319-6332.
- Paulk AC, Gronenberg W (2008) Higher order visual input to the mushroom bodies in the bee, *Bombus impatiens*. Arthropod Struct Dev 37: 443–458.
- Paulk AC, Dacks AM, Gronenberg W (2009) Color processing in the medulla of the bumblebee (*Apidae: Bombus impatiens*). J Comp Neurol 513: 441- 456.
- Peitsch D, Feitz A, Hertel H, de Souza J, Ventura DF and Menzel R (1992) The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. J Comp Physiol A 170: 23- 40.
- Pfeiffer K, Kinoshita M, Homberg U (2005) Polarization-sensitive and light-sensitive neurons in two parallel pathways passing through the anterior optic tubercle in the locust brain. J Neurophysiol 94:3903-3915.

- Pfeiffer K, Homberg U, (2007) Coding of Azimuthal Directions via Time-Compensated Combination of Celestial Compass Cues - *Current Biology* 17, 960–965
- Ribi WA (1975a) The first optic ganglion of the bee. I. Correlation between visual cell types and their terminals in the lamina and medulla. *Cell Tissue Res* 165: 103-111.
- Ribi WA (1975b) The neurons of the first optic ganglion of the bee (*Apis mellifera*). *Adv Anat Embryol Cell Biol* 50: 1-43.
- Ribi WA, Scheel M (1981) The second and third optic ganglia of the worker bee: Golgi studies of the neuronal elements in the medulla and lobula. *Cell Tissue Res* 221:17-43.
- Ribi W, Warrant E, Zeil J (2011). The organization of honeybee ocelli: Regional specializations and rhabdom arrangements, *Arthropod Structure & Development*. 40- 6, 509–520
- Rossel S, Wehner R (1986) Polarization vision in bees. *Nature* 323:128-131.
- Sandeman, D.C., Sandeman, R.E., de Couet, H.G., (1990) Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *Journal of Neurobiology* 21, 619e629.
- Sitnik N, Tokmacheva E, Savvateeva-Popova E (2003) The Ability of *Drosophila* Mutants with Defects in the Central Complex and Mushroom Bodies to Learn and Form Memories - *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 33, No. 1.
- Skorupski P, Chittka L (2010) Differences in photoreceptor processing speed for chromatic and achromatic vision in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *J Neurosci* 30: 3896-3903.
- Srinivasan MV, Zhang SW, Witney K (1994) Visual discrimination of pattern orientation in honeybees: Performance and implications for “cortical” processing. *Philos Trans R Soc B* 343: 199-210.
- Strausfeld NJ (1989) Beneath the compound eye: neuroanatomical analysis and physiological correlates in the study of insect vision. In: *Facets of vision* (Stavenga DG and Hardie RC, Eds.), Heidelberg, Springer, New York, pp. 318-359.
- Strausfeld NJ, Lee JK (1991) Neuronal basis for parallel visual processing in the fly. *Visual Neuroscience* 7:13-33.
- Strausfeld, NJ (1998). Crustacean e insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain, Behavior and Evolution* 52, 186e206.
- Strauss R (2002)The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour - *Current Opinion in Neurobiology*, 12:633–638
- Vitzthum H, Muller M, Homberg U, (2002) Neurons of the Central Complex of the Locust *Schistocerca gregaria* are Sensitive to Polarized Light - *The Journal of Neuroscience*, 22(3):1114–1125
- Wade NJ, Swanson M (1991) *Visual Perception: An Introduction*. Routledge, Chapman and Hall Inc., New York.
- Wakakuwa M, Kurasawa M, Giurfa M, Arikawa K (2005) Spectral heterogeneity of honeybee ommatidia. *Naturwissenschaften* 92: 464-467.
- Wehner R, Rossel S (1985) The bee's celestial compass: a case study in behavioural neurobiology. In: *Experimental behavioral ecology and sociobiology* (Hölldobler B and Lindauer M, Eds.), Fischer, Stuttgart, pp. 11-54.
- Yamaguchi S, Wolf R, Desplan C, Heisenberg M (2008) Motion vision is independent of color in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4910-4915.
- Yang EC, Lin HC, Hung YS (2004) Patterns of chromatic information processing in the lobula of the honeybee, *Apis mellifera* L. *J Insect Physiol* 50: 913-925.

